

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

Scuola di Dottorato in Scienze Morfologiche, Fisiologiche e dello Sport

Dipartimento di Morfologia Umana e Scienze Biomediche “Città Studi”



XXIV ciclo del Corso di Dottorato di ricerca in Scienze Morfologiche

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA :

ESPRESSIONE DEI RECETTORI Toll-like IN ORGANI MURINI ADULTI ED EMBRIONALI

SSD BIO/16, BIO/17

Dott.ssa Alessandra MENON

Matricola: R08151

TUTOR: Prof.ssa Isabella BARAJON

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Prof.ssa Laura VIZZOTTO

Anno Accademico 2010-2011

RIASSUNTO	Errore. Il segnalibro non è definito.
INDICE	Errore. Il segnalibro non è definito.
INTRODUZIONE.....	4
1. La proteina Toll in Drosophila melanogaster	5
1.1 Ruolo embriogenesi	5
1.2 Ruolo immunitario.....	6
2. TLRs nei mammiferi.....	10
3. Toll-like receptors: un sistema altamente conservato	15
4. Scopo della ricerca	18
MATERIALI e METODI	20
1. Animali utilizzati.....	21
2. Preparazione delle sezioni istologiche	21
2.1 Prelievo, fissazione e inclusione dei campioni	21
2.2 Sezionamento e montaggio delle sezioni istologiche	23
3. Colorazioni istologiche	24
3.1 Ematossilina Eosina.....	24
3.2 Tricromica di Masson (Goldner, 1938)	26
4. Procedure di immunolocalizzazione	27
4.1 Protocolli di immunoistochimica (TLR4 e TLR7)	27
4.2 Protocolli di Immunofluorescenza doppia (TLR4 o TLR7 e PCNA o PGP 9.5)	29
4.3 Osservazione delle sezioni istologiche	31
RISULTATI.....	32
1. Espressione dei recettori TLR4 and TLR7 in gangli paravertebrali durante lo sviluppo embrionale:.....	33
2. Espressione dei recettori TLR4 and TLR7 in surrene, fegato e pancreas adulti e durante lo sviluppo embrionale:.....	34
2.1 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel surrene durante lo sviluppo embrionale murino	34
2.2 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel surrene di topo adulto	34
2.3 Espressione di recettori TLR4 e TLR7 nel pancreas durante lo sviluppo embrionale murino	35
2.4 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel pancreas di topo adulto	36

2.5	Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel fegato durante lo sviluppo embrionale murino	36
2.6	Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel fegato di topo adulto	36
TAVOLE.....		38
DISCUSSIONE.....		40
1.	Espressione di TLR4 e TLR7 in gangli paravertebrali murini embrionali	41
2.	Dal surrene embrionale al surrene adulto	44
3.	Dal pancreas embrionale al pancreas adulto	49
4.	Dal fegato embrionale al fegato adulto	54
5.	Significato generale espressione embrionale dei TLR.....	58
BIBLIOGRAFIA		60

INTRODUZIONE

1. La proteina Toll in *Drosophila melanogaster*

1.1 Ruolo embriogenesi

La proteina recettoriale Toll è stata identificata per la prima volta nel 1985 dalla biologa tedesca Christiane Nüsslein-Volhard e da i suoi collaboratori nell'ambito di alcune ricerche volte ad identificare i geni coinvolti nello sviluppo embrionale del moscerino della frutta, *Drosophila melanogaster* (Anderson, et al., 1985).

Gli esami effettuati da questi ricercatori, basati sulla rivoluzionaria tecnica di mutagenesi di saturazione sviluppata da Christiane Nüsslein-Volhard e Eric F. Wieschaus, identificarono un gruppo di 10-15 geni responsabili del controllo della segmentazione embrionale. Per questo approccio pionieristico essi vennero insigniti, insieme a Edward B. Lewis, del Premio Nobel per la Medicina nel 1995 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1995/).

Durante i successivi 10 anni, tutti i geni del gruppo dorsale (tra cui Toll, Tube, Pelle, Cactus, Dorsal e sette geni a monte di Toll) furono clonati e cominciò a delinearsi un modello riguardante la determinazione dell'asse dorso ventrale dell'embrione.

La leggenda racconta che il nome "Toll" fu coniato da Nusslein-Volhard, che, dopo aver osservato al microscopio un tipo molto particolare di moscerino, esclamò "das war toll", un'espressione difficile da rendere con esattezza in italiano ma all'incirca significa "bizzarro", "incredibile", "folle". Infatti, femmine di moscerino in cui la funzionalità di Toll era stata soppressa (si parla di null of function mutants) producevano embrioni fortemente "dorsalizzati", che perdevano cioè le strutture ventrali ed avevano solo strutture dorsali, mentre quelle che portavano un dominante aumento di funzione generavano embrioni fortemente "ventralizzati" (Anderson, Bokla and Nusslein-Volhard, 1985). Il bizzarro fenotipo di questo mutante era dovuto ad un difetto nel pathway di segnalazione del gruppo dorsale, necessario per lo sviluppo di strutture ventrali tra cui il mesoderma e l'ectoderma neurogenico.

Il sistema dorsale, chiamato così per gli effetti delle sue mutazioni (dorsalizzanti) piuttosto che per il ruolo dei loro prodotti genici, è quindi responsabile del processo di determinazione dell'asse dorso-ventrale durante lo sviluppo embrionale.

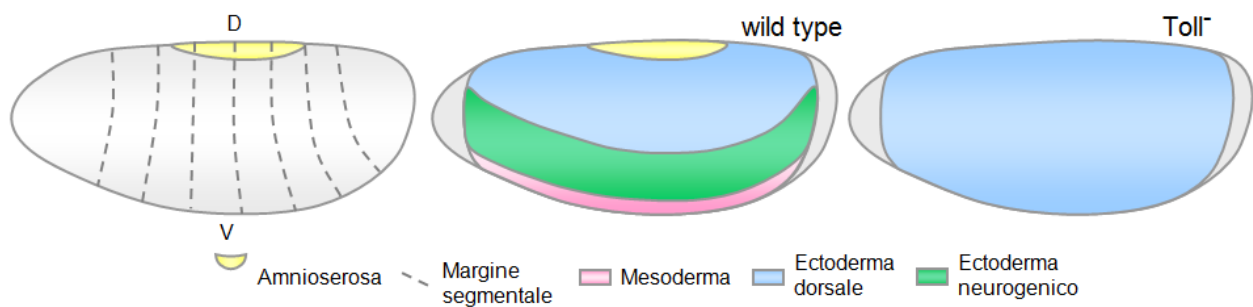


FIGURA 1: Questi disegni mostrano sezioni sagittali di embrioni di *Drosophila melanogaster*: mentre gli embrioni wild type sviluppano distinte strutture dorsali e ventrali, gli embrioni mutanti per il gene Toll (Toll-) risultano completamente dorsalizzati. Disegnato da (Sommer, 2009).

Il sequenziamento di *Toll*, nel 1988, rivelò una struttura tripartita con una regione N-terminale, una sequenza transmembrana e un dominio C-terminale di struttura e funzione sconosciuta. Un importante sviluppo, nei primi anni '90, fu la scoperta che il dominio C-terminale divideva un alto grado di omologia con il dominio segnale del recettore per l'interleuchina-1 (IL-1) dei vertebrati (Gay and Keith, 1991). L'IL-1 è una citochina con un chiaro ruolo nell'attivazione di processi infiammatori acuti, in risposta ad infezioni batteriche nei mammiferi.

Questa scoperta fu importante in quanto suggerì che questo dominio, ora conosciuto come dominio del recettore IL-1/Toll, era coinvolto nei processi di trasmissione del segnale non solo nel contesto ristretto dello sviluppo di *Drosophila*, ma anche nella generazione di risposte iniziali all'infezione da parte di cellule del sistema immunitario umano.

1.2 Ruolo immunitario

Questo dato ricevette un significativo supporto nel 1995 quando il gruppo di Hoffmann scoprì che in *Drosophila* Toll e alcuni altri membri del gruppo dorsale giocavano anche importanti ruoli nella risposta immunitaria innata contro infezioni funginee (Leulier and Lemaitre, 2008). I ricercatori notarono che *null of function mutants* per Toll, ovvero mutazioni che causano perdita di funzione di Toll, compromettevano la sopravvivenza dei moscerini adulti infettati da un particolare fungo, *Aspergillus fumigatus*, e la trascrizione del peptide antifungineo *Drosomycin*, implicando Toll nella difesa dell'ospite dai funghi (Hoffmann, 2003).

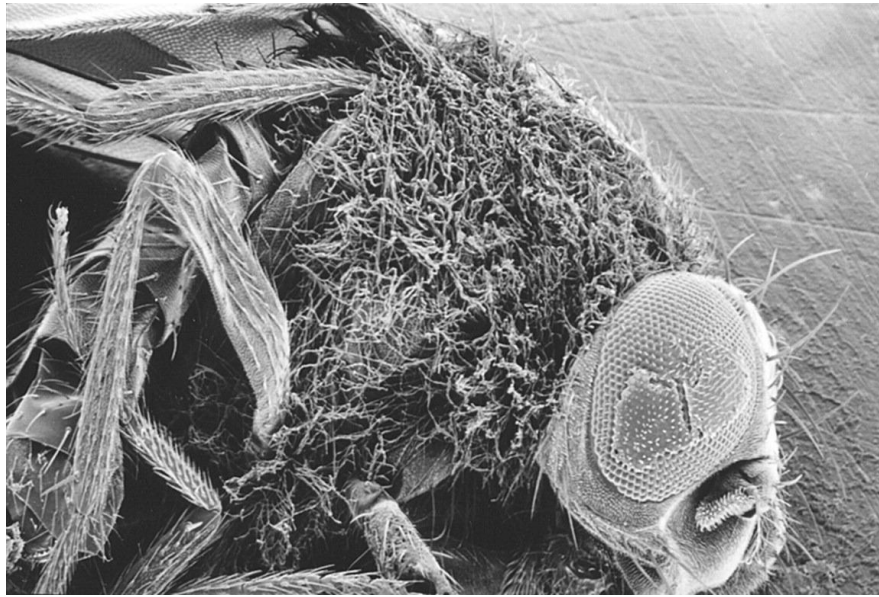


FIGURA 2: Classica micrografia elettronica a scansione (200x) di mutante di *Drosophila* per il gene Toll che sta soccombendo all'infezione da *Aspergillus fumigatus* ed è ricoperto quasi interamente da ife germinanti (Lemaitre, et al., 1996).

Qualche anno dopo fu scoperto che anche un altro membro della famiglia Toll di *Drosophila*, chiamato Toll2 o 18-wheeler, oltre ad un'importante funzione nell'embriogenesi e nello sviluppo post embrionale (Eldon, et al., 1994, Leulier and Lemaitre, 2008), aveva un ruolo cruciale nel mediare le risposte antibatteriche (Williams, et al., 1997).

Più tardi studi genetici sulla capacità di *Drosophila* di difendersi dall'attacco di patogeni, hanno evidenziato che l'attivazione del pathway di Toll avveniva anche in risposta ad infezioni da batteri gram-negativi (Michel, et al., 2001).

Nel loro insieme questi studi hanno rivelato che la funzionalità di Toll in *Drosophila* non è confinata solo allo sviluppo embrionale, ma che Toll gioca anche un ruolo essenziale nella risposta immunitaria innata a funghi e batteri nell'organismo adulto.

Tale scoperta promosse la ricerca nei mammiferi di recettori simili a Toll. Il primo omologo umano del gene Toll di *Drosophila* fu descritto da Nomura e colleghi nel 1994, e siccome la funzione immunitaria del Toll in *Drosophila* non era ancora conosciuta si dedusse che TIL (ora conosciuto come TLR1) potesse partecipare allo sviluppo nei mammiferi (Nomura, et al., 1994).

Nel 1997 Charles Janeway e Ruslan Medzhitov clonarono con successo un altro omologo di Toll, ora conosciuto come TLR4, e mostrarono che era in grado di attivare il fattore di trascrizione *Nuclear Factor Kappa B* (NF- κ B) (Janeway and Medzhitov, 2002).

La rilevanza immunitaria del TLR4 nei mammiferi fu chiaramente mostrata da Beutler e colleghi in un modello murino. Questi ricercatori utilizzarono una particolare tecnica di clonaggio, definita

posizionale, per dimostrare che topi che non erano in grado di rispondere ad un potente componente immuno-stimolatorio di membrana dei batteri gram-negativi, il lipopolisaccaride (LPS), presentavano mutazioni con perdita di funzione per il recettore TLR4 (Poltorak, et al., 1998). Questi studi identificarono il recettore TLR4 come uno dei componenti chiave coinvolto nel riconoscimento dell'LPS.

Le due scoperte di Hoffmann e Beutler consentirono di identificare un sistema molecolare sensorio (Toll/TLR), comune ad insetti e mammiferi, essenziale per indurre la prima linea di difesa dell'ospite contro l'attacco di /microrganismi, e valsero loro il premio Nobel per la Medicina o Fisiologia 2011 (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2011/).

Questi risultati portarono ad una rapida espansione delle ricerche nel campo dell'immunità innata e portarono C. Janeway a postulare l'esistenza di un sistema di riconoscimento in grado di rispondere a differenti componenti microbiche.

Nei mammiferi sono stati scoperti diversi omologhi della proteina Toll presente in *Drosophila melanogaster*, per i quali è stato coniato il termine *Toll-like receptors*, TLR (Rock, et al., 1998).

Il *signaling* di Toll in *Drosophila melanogaster*: embriogenesi e organogenesi, risposte immunitarie
Durante l'oogenesi, una molecola segnale localizzata sulla parete ventrale delle cellule del follicolo ovarico determina l'inizio di una cascata proteolitica nello spazio perivitellino fuori dall'embrione fecondato, che culmina con l'attivazione di una molecola chiamata Spätzle.

La forma attiva di Spätzle si lega come dimero al dominio extracellulare del recettore Toll (il primo componente del pathway che agisce nell'oocita), solo sul versante ventrale dello spazio perivitellino. L'attivazione di Toll porta alla stimolazione di un *pathway* intracellulare che coinvolge le proteine adattatrici Tube e MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein* 88) e la serotini-chinasi Pelle, unite a formare un complesso eterotrimerico, che in ultimo porta alla fosforilazione, ubiquitinazione e degradazione di Cactus.

A seguito della fecondazione, Pelle attiva la cascata fosforilativa che determina la fosforilazione del complesso citoplasmatico inattivo Cactus-Dorsal. Dopo la fosforilazione, Cactus si dissocia da Dorsal e la successiva ubiquitinazione porta Cactus alla degradazione, ciò consente la traslocazione di Dorsal nel nucleo e l'attivazione trascrizionale di un pool di geni (tra cui *Drosomycin*) coinvolti nella determinazione della polarità dorso-ventrale dell'embrione (Leulier and Lemaitre, 2008; Valanne et al., 2011; Gay and gangloff, 2007).

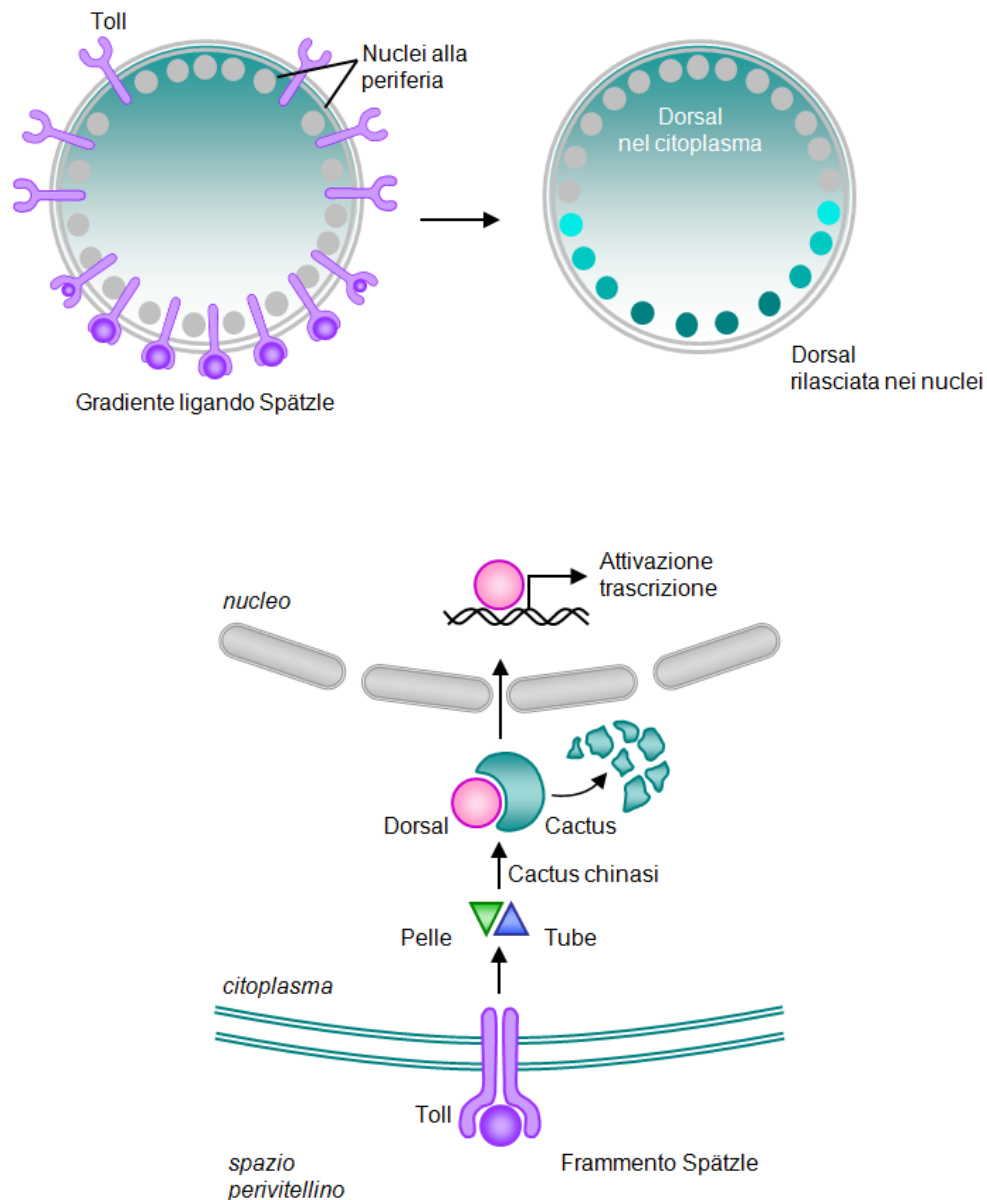


FIGURA 3 : Schematizzazione della cascata intracellulare di trasduzione del segnale di Toll in *Drosophila*.

Nello sviluppo embrionale più avanzato, la proteina Toll dimostra, inoltre, di svolgere un'importante funzione nella regolazione dell'organogenesi. Infatti la perdita della funzionalità di Toll induce difetti nello sviluppo della muscolatura. Embrioni mutati per Spätzle, Tube e Pelle mostrano le stesse mutazioni suggerendo che il pathway di segnale della proteina Toll, che include il suo ligando extracellulare, controlla lo sviluppo muscolare. Inoltre difetti nel corretto sviluppo dei prolungamenti di motoneuroni sono stati osservati negli embrioni che presentano mutazioni per la proteina Toll. Infatti, in condizioni normali, il cono di crescita di alcuni motoneuroni si estende passando attraverso cellule muscolari che esprimono sulla loro superficie la proteina Toll, ma, quando raggiunge la cellula muscolare bersaglio, inizia a formare una sinapsi solo dopo che l'espressione della proteina Toll è stata downregolata (Rose, et al.,1997). Quindi la dinamica

espressione della proteina Toll nella muscolatura regola lo sviluppo delle sinapsi dei motoneuroni e contribuisce al controllo locale dello sviluppo della rete nervosa.

Toll è anche essenziale durante la seconda fase di formazione del cuore per il corretto allineamento e la migrazione dei cardioblasti (Wang, et al., 2005).

Sebbene i precisi meccanismi molecolari che sottostanno a questi differenti processi non siano ancora chiari, si può osservare che tutti gli eventi in cui la proteina Toll è implicata richiedono la comunicazione cellulare. Questo suggerisce che un aspetto delle funzioni di Toll nello sviluppo sia promuovere l'interazione e l'adesione cellulare. Infatti proteine contenenti domini *Leucine-Rich Receptor* (LRR), come anche la proteina Toll, sono spesso implicate nell'adesione cellulare.

Nelle fasi tardive dello sviluppo del moscerino della frutta, Toll acquisisce un ruolo centrale nel determinare l'espressione di una "batteria" di geni coinvolti nelle risposte immunitarie. La cascata di segnale che controlla le risposte antimicrobiche differisce dal pathway di segnale coinvolto nella corretta determinazione dell'asse dorso ventrale a due livelli. Primo, le infezioni microbiche vengono riconosciute da specifiche proteine che circolano nel sangue dell'insetto e che, dopo essersi legate alla componente microbica, determinano l'attivazione del ligando della proteina Toll, Spätzle, attraverso una distinta e complessa cascata proteolitica. Secondo, in questo pathway di segnale viene utilizzato un fattore di trascrizione differente da Dorsal, appartenente sempre alla famiglia NF- κ B, chiamato Dif (*Dorsal-related immunity factor*) (Leulier and Lemaitre, 2008).

Il *pathway* di Toll è stato implicato anche in altri aspetti della risposta immunitaria innata in *Drosophila*, quali la regolazione della proliferazione e densità degli emociti nella larva (Qiu, et al., 1998).

Risulta chiaro quindi che il recettore Toll di *Drosophila* sia un chiaro esempio di molecola multifunzionale in grado di usare differenti *partner* a monte e a valle in diversi contesti.

2. TLRs nei mammiferi

Nei mammiferi, i recettori della famiglia *Toll-like* (TLR) sono stati principalmente studiati grazie al loro ruolo di *Pathogen Recognition Receptors* (PRR) che permette al sistema immunitario innato di riconoscere direttamente e rapidamente motivi molecolari comuni a numerosi microrganismi patogeni, potenzialmente patogeni e commensali, detti *Microrganism Association Molecular Patterns* (MAMP) (Kaisho, et al., 2006).

Come la proteina *Toll*, i TLR dei mammiferi sono proteine transmembrana di tipo 1 altamente conservate lungo la scala evolutiva, che presentano un dominio extracellulare contenente ripetizioni

di leucina (*leucine-rich repeats domain*, LRR) fiancheggiato da motivi ricchi di cisterna (che media il riconoscimento dei MAMP); un dominio transmembrana ed un dominio intracellulare, compatto e globulare, caratterizzato dalla presenza di tre regioni altamente omologhe a quelle del recettore dell'IL-1, chiamato Toll/IL-1 receptor domain (TIR), richiesto per la traduzione del segnale (Akira, 2006, Pathogen recognition and innate immunity).

Sulla base di questa considerevole omologia nella regione citoplasmatica, i recettori TLR vengono considerati membri di una più ampia superfamiglia che include i recettori per l'IL-1.

Lo studio della struttura molecolare della regione extracellulare del TLR3 umano rivela che i motivi LRR formano un solenoide a forma di ferro di cavallo, la cui superficie concava risulta direttamente coinvolta nelle interazioni con il ligando (MAMP). I motivi LRR forniscono, quindi, un'impalcatura strutturale molto versatile per la formazione delle interazioni proteina- proteina.

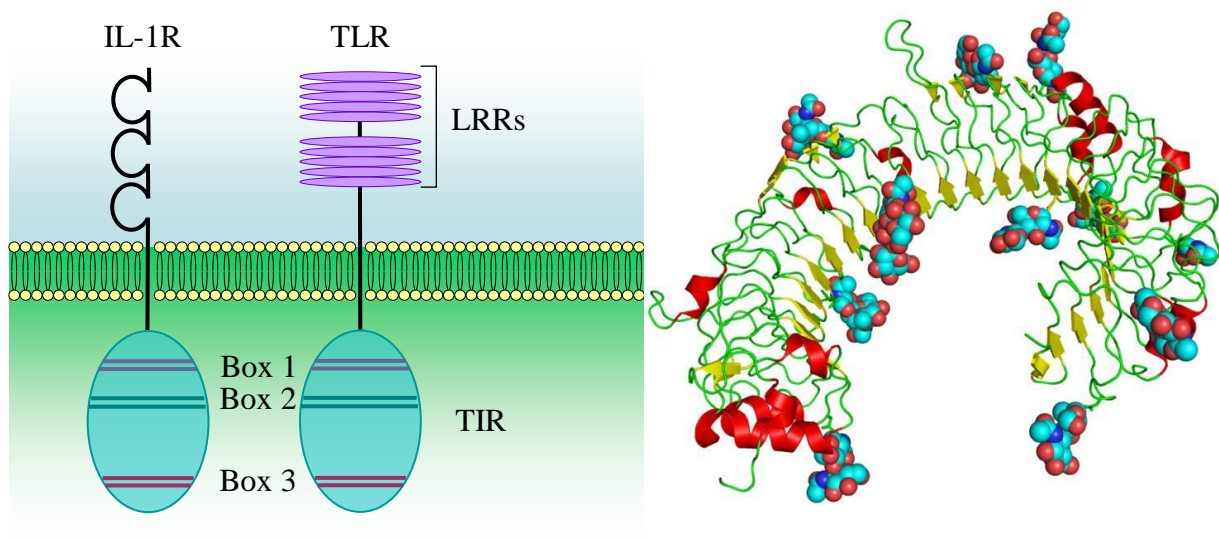


FIGURA 4: Struttura del recettore TLR: a | Il dominio TIR è caratterizzato dalla presenza di 3 regioni altamente omologhe, dette box 1, 1 e 3. b | Immagine tridimensionale della struttura proteica del dominio LRR.

Fino ad oggi nei mammiferi sono stati identificati 13 differenti TLR funzionali, di cui 10 nell'uomo (1-10) e 12 nel topo (1-9; 11-13) (con TLR1-9 conservati in entrambi), ognuno caratterizzato da una propria struttura proteica. Il TLR10 nel topo non è funzionale a causa dell'inserzione di un retrovirus, e il TLR11, -12 e -13 sono stati persi dal genoma umano (Kawai and Akira, 2010, Kumar, et al., 2009).

La specifica localizzazione del TLR è correlata per certi versi ai pattern molecolari dei loro ligandi ed è ritenuta molto importante per l'accessibilità del ligando, il mantenimento della tolleranza a molecole endogene, come ad esempio gli acidi nucleici e downstream della traduzione del segnale (Kawai T. and Akira S., 2010). Questi recettori possono essere classificati in diverse sottofamiglie

in base alla loro localizzazione cellulare e al tipo di ligando (MAMP) che riconoscono (Tabella 1). I recettori *Toll-like* (TLR1, -2, -4, -5 e -6) che legano principalmente componenti microbiche di membrana come ad esempio lipidi, lipoproteine e proteine sono essenzialmente localizzati sulla superficie cellulare, mentre i TLR coinvolti nel riconoscimento di strutture come acidi nucleici di virus e batteri sono trovati quasi esclusivamente in compartimenti intracellulari, come endosomi, reticolo endoplasmatico, lisosomi e endolisosomi (Takeda and Akira, 2005, Tang, et al., 2007). I principali ligandi riconosciuti dai differenti TLR sono riassunti nella Tabella 1.

In particolare, strutture lipidiche sono riconosciute dal TLR2 (in combinazione con il TLR1 e -6) e dal TLR4 (come omodimero). Quest'ultimo riconosce in maniera specifica il lipopolisaccaride (LPS), una componente specifica della parete cellulare dei batteri Gram-negativi, ed anche altri ligandi, tra cui Heat Shock Protein (HSP) dell'ospite ed antigeni proteici dei virus (Hoshino, et al., 1999). Gli acidi nucleici, presenti in virus e batteri, sono riconosciuti dal TLR3, -7, -9: in modo più specifico il TLR3 lega l'RNA a doppio filamento (dsRNA), il TLR7 riconosce l'RNA a singolo filamento (ssRNA) e il TLR9 si associa ad una sequenza specifica non metilata, detta CpG, presente in grande quantità nel DNA batterico (O'Neill, et al., 2006).

Recettore	Ligando	Origine del ligando
TLR1	Triacyl lipopeptides	Bacteria and mycobacteria
	Soluble factors	Neisseria meningitides
TLR2	Lipoprotein/lipopeptides	Various pathogens
	Peptidoglycan	Gram-positive bacteria
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria
	Lipoarabinomannan	Mycobacteria
	Phenol-soluble modulins	Staphylococcus epidermidis
	Glycoinositolphospholipids	Trypanosoma cruzi
	Glycolipids	Treponema maltophilum
	Porins	Neisseria
	Atypical lipopolysaccharide	Leptospira interrogans
	Atypical lipopolysaccharide	Porphyromonas gingivalis
	Zymosan	Fungi
	Heat-shock protein 70	Host
TLR3	Double-stranded RNA	Viruses
TLR4	Lipopolysaccharide	Gram-negative bacteria
	Taxol	Plants
	Fusion protein	Respiratory syncytial virus
	Envelope protein	Mouse mammary-tumour virus
	Heat-shock protein 60	Chlamydia pneumoniae
	Heat-shock protein 70	Host
	Type III repeat extra domain A of fibronectin	Host
	Oligosaccharides of hyaluronic acid	Host
	Polysaccharide fragments of heparin sulphate	Host
	Fibrinogen*	Host
TLR5	Flagellin	Bacteria
TLR6	Diacyl lipopeptides	Mycoplasma
	Lipoteichoic acid	Gram-positive bacteria
	Zymosan	Fungi
TLR7	Imidazoquinoline	Synthetic compounds
	Loxoribine	Synthetic compounds
	Bropiramine	Synthetic compounds
	Single-stranded RNA	Viruses
TLR8	Imidazoquinoline	Synthetic compounds
	Single-stranded RNA	Viruses
TLR9	CpG-containing DNA	Bacteria and viruses
TLR10	N.D.	N.D.
TLR11	N.D.	Uropathogenic bacteria

TABELLA 1: I recettori Toll-like e i loro ligandi specifici.

Recenti studi suggeriscono un possibile coinvolgimento dei TLR nel riconoscimento di ligandi endogeni, tra i quali molte proteine intracellulari, acidi nucleici e componenti della matrice extracellulare, anche se ad oggi non ci sono dati che ne dimostrino una diretta interazione (Sloane et al., 2010).

A differenza di ciò che accade nella *Drosophila melanogaster*, dove la proteina Toll non riconosce direttamente le componenti microbiche ma necessita dell'intervento di altre proteine, nei mammiferi è proprio la stessa proteina a riconoscere e legare direttamente le componenti batteriche o virali patogene.

Il legame dei TLR con i propri ligandi genera risposte rapide e localizzate mediante l'induzione di una complessa cascata intracellulare di trasduzione del segnale che prevede il reclutamento di proteine adattatrici Myd88, che porta all'attivazione della chinasi IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*, omologo di Pelle in *Drosophila*) ed alla conseguente fosforilazione e degradazione di I- κ B (*Inhibitor of NF- κ B*, omologo di Cactus in *Drosophila*), che induce la rapida traslocazione nucleare di NF- κ B. L'attivazione di questo fattore determina la trascrizione di geni che codificano per citochine pro-infiammatorie, chemochine e molecole antimicrobiche, inducendo così una risposta immunitaria locale (Harris, et al., 2006).

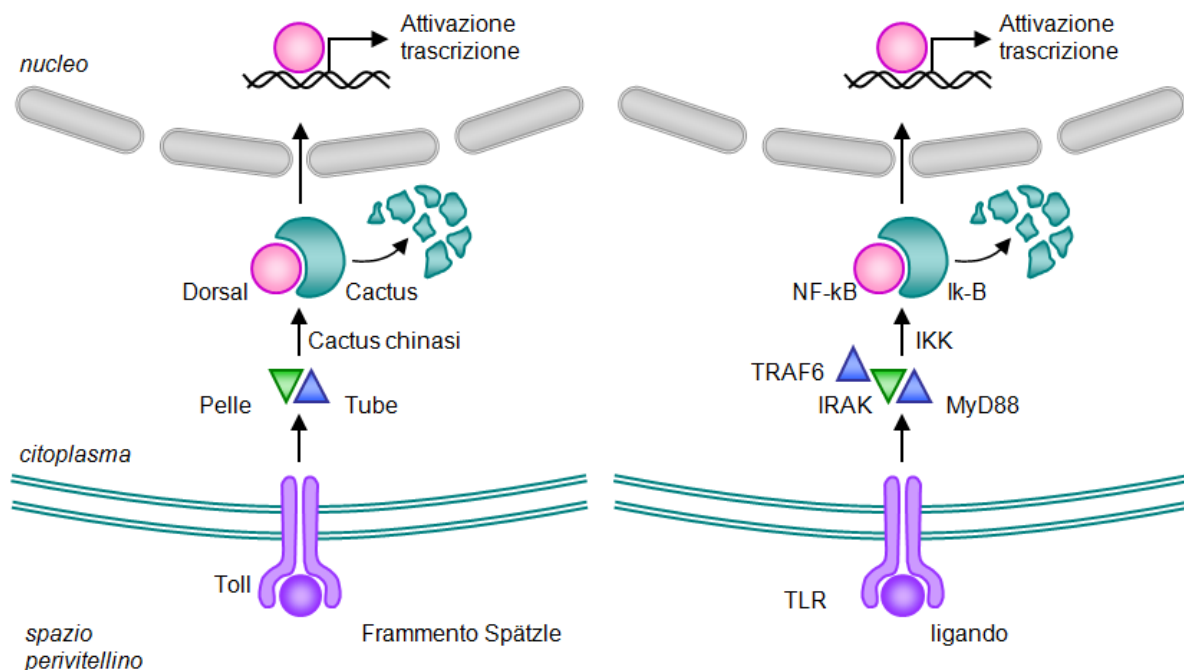


FIGURA 5 : Schematizzazione della cascata intracellulare di trasduzione del segnale

D'altro canto, l'interazione dei TLR con i microrganismi commensali, in particolare quelli dell'intestino, appare essere assai complessa. In condizione normali, essa contribuisce al mantenimento della barriera epiteliale e dell'omeostasi tissutale ma, quando sregolata, può portare allo sviluppo di patologie infiammatorie (Cario, 2005; Harris et al., 2006).

3. Toll-like receptors: un sistema altamente conservato

Sebbene ci siano sostanziali differenze nelle modalità di riconoscimento del ligando (infatti, in *Drosophila* Toll non riconosce direttamente i microrganismi, come avviene nei mammiferi, ma è attivato dal suo ligando endogeno, Spatzle) e nel sistema di regolazione che controlla il processo di trasmissione del segnale, è evidente che diversi elementi del *pathway* di Toll si siano conservati durante l'evoluzione da insetti a vertebrati (Gay N.J. and Gangloff M., 2007).

Analisi filogenetiche condotte da Roach e colleghi sostengono che una forte pressione selettiva per il mantenimento del riconoscimento di specifiche classi di MAMP ha dominato l'evoluzione della maggior parte delle famiglie di TLR in tutti i vertebrati consentendo loro di mantenere un repertorio largamente immutato di ligandi. Quest'alta conservazione è quasi sicuramente dovuta al fatto che, nella maggior parte dei casi, i microbi non mutano facilmente i loro MAMP. Nel caso di *Drosophila*, l'alta conservazione potrebbe piuttosto essere guidata dalla pressione per mantenere la rete di segnali endogeni (Roach J.C. et al., 2005).

Recenti dati genomici, ottenuti da diversi organismi dai vertebrati agli cnidari, suggeriscono che i geni *TLR* siano presenti in molti eumetazoi, con la probabile eccezione dei platelminti, ed assenti da *phyla* non animali, quali piante e funghi (FIGURA 6).

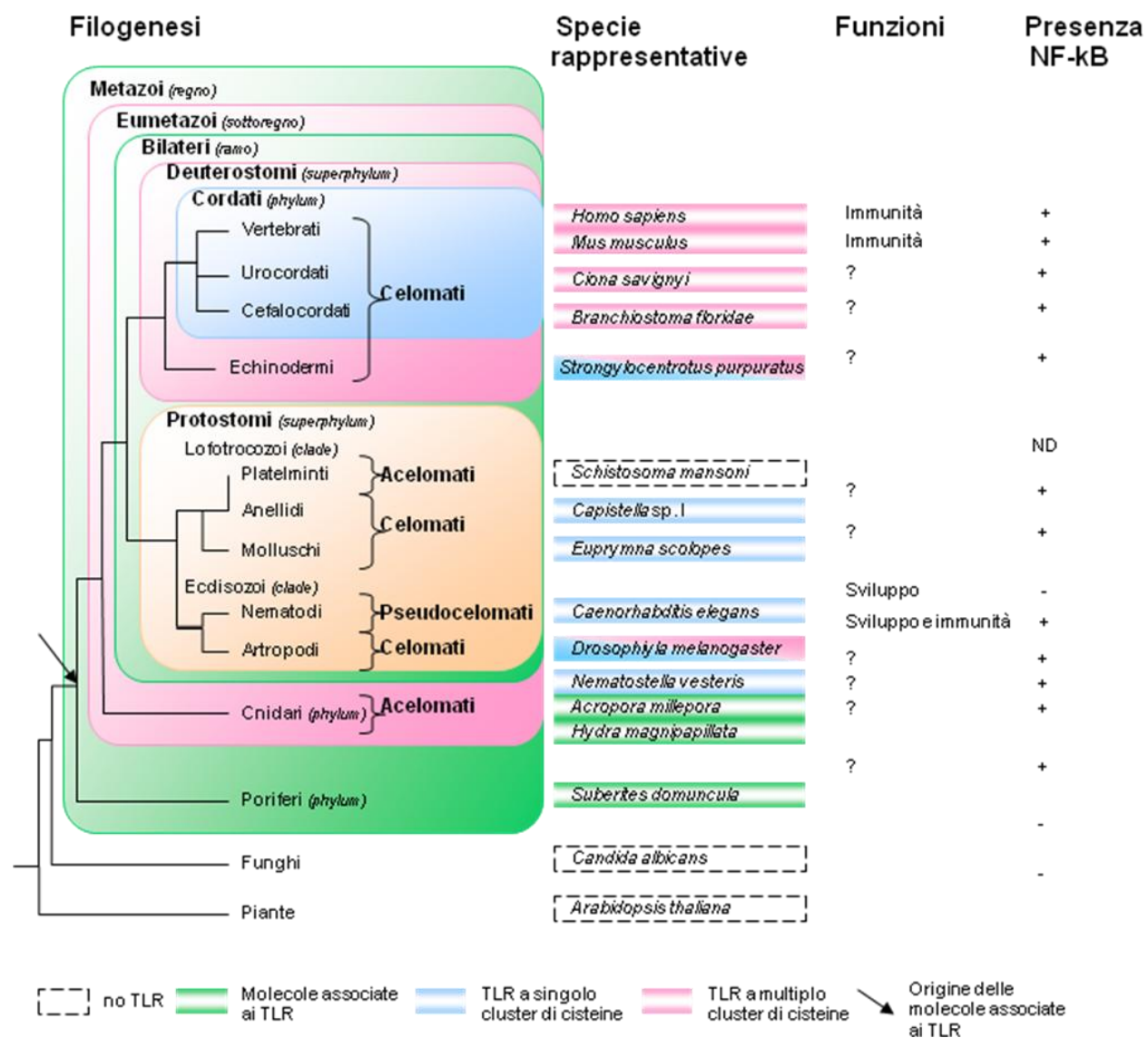


FIGURA 6: Rappresentazione schematica della conservazione dei TLR lungo la scala evolutiva

I TLR potrebbero essere stati persi in uno specifico *phylum* come quello dei platelminti, a seguito della particolare storia evolutiva dei vermi piatti che ha portato ad importanti semplificazioni fisiologiche e dello sviluppo.

Le molecole connesse ai TLR, ritrovate in specie di cnidari molto divergenti e in diverse spugne, suggeriscono che i geni correlati ai TLR emersero da un antenato comune a tutti i *phyla* animali più di 700 milioni di anni fa, prima della separazione di bilaterali e cnidari.

Analisi di sequenza degli domini extracellulari dei TLR indicano l'esistenza di due principali tipi di strutture: a singolo e a multiplo cluster di cisteine. Il primo tipo di dominio caratterizza la maggior parte dei TLR trovati nei deuterostomi e in *Drosophila* (Toll9). Il secondo tipo di organizzazione è invece tipico dei protostomi, ma è stato recentemente identificato anche in un deuterostomo invertebrato *Strongylocentrotus purpuratus* (una specie di riccio di mare) e in uno cnidario *Nematostella vectensis* (una specie di anemone di mare). Tutto ciò suggerisce che i TLR con multipli cluster di cisteine riflettano la struttura del dominio ancestrale dei TLR, che era già presente nell'antenato eumetazoo (Figura. ..).

Studi funzionali, condotti finora solo su poche specie (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegyptis* e *Tribolium castaneum*) hanno rivelato che i TLR giocano importanti funzioni nell'immunità e/o nello sviluppo.

La funzione immunitaria risulta conservata anche in un altro diptero, *Aedes aegyptis*. Studi di *null of function* per il gene *Toll5A*, omologo di Toll, portano l'organismo adulto ad essere maggiormente suscettibile ad infezioni funginee.

L'esistenza di un *pathway* Toll-Dorsal richiesto per la determinazione dell'asse dorso-ventrale è stata dimostrata anche in alcuni coleotteri, quale ad esempio *Tribolium castaneum*, dimostrando che questo meccanismo è probabilmente comune a tutti gli insetti olometaboli, nei quali cioè lo sviluppo da giovane ad adulto non è caratterizzato da graduali modificazioni, ma da tre ben distinti stadi: larva, pupa e adulto (Hoffmann 1999). Tuttavia, a differenza di quanto osservato in *Drosophila melanogaster*, mutanti di *Tribolium castaneum* in cui la funzionalità di Toll era stata soppressa producevano embrioni privi del sistema nervoso centrale e dell'amnios (Sommer R. J., 2009).

Ad eccezione dei nematodi, la presenza di geni TLR in vari genomi è sempre correlata con la presenza di transattivatori di NF- κ B. Questo, insieme alle somiglianze ben stabilite tra le vie di segnale NF- κ B controllata dai TLR in *Drosophila* e nei mammiferi, suggerisce un antico legame tra i TLR e NF- κ B che potrebbe risalire all'origine della funzione dei TLR.

Analisi filogenetiche dei TLR e di alcune componenti del loro *signalling* in differenti organismi suggeriscono che la loro funzione nell'ambito delle risposte immunitarie sia quella più ancestrale

(Roth, et al., 2003). Al contrario, Kanzok e colleghi propongono che i geni TLR abbiano avuto primariamente origine nell'ambito dei meccanismi che regolano lo sviluppo dell'organismo e che solo successivamente abbiano assunto nei celomati (ma non negli pseudocelomati) un ruolo immunitario (Kanzok S. M. et al., 2004).

Analisi filogenetiche del dominio TIR supportano l'ipotesi che i geni *TLR*, pur provenendo da un antenato comune, si siano sviluppati indipendentemente in celomati protostomi (*ad esempio artropodi*) e deuterostomi (*ad esempio mammiferi*), suggerendo una divergenza funzionale tra TLR lungo la scala evolutiva.

Ad oggi non è chiaro quando il ruolo dei TLR nello sviluppo apparve, ma studi funzionali sui TLR nei lofotrocozoi (in particolare nel platelminta *Schistosoma mansoni*) e cnidari potrebbero aiutarci a fare luce sull'assenza di geni TLR negli acelomati e sullo scopo e sulla funzione dei TLR nel progenitore eumetazoo.

4. Scopo della ricerca

Nei mammiferi adulti, i recettori Toll-like sono largamente espressi in diverse cellule immunitarie, come mastociti, cellule natural killer, cellule B e T specifiche, macrofagi, monociti, cellule dendritiche, neutrofili e basofili, e anche in cellule non immunitarie, quali ad esempio, fibroblasti, cellule epiteliali ed endoteliali di organi cavi e parenchimatosi.

Dati recenti presenti in letteratura hanno evidenziato l'espressione dei recettori TLR in altri tipi cellulari tra cui cellule del sistema nervoso adulto. Nel sistema nervoso centrale, queste proteine sono espresse, in condizioni fisiologiche, dalle cellule gliali e dalla microglia (Bsibsi et al., 2002; Kielian, 2006) e, in condizione patologiche, anche dai neuroni (Lafon et al., 2006; Jackson et al., 2006). Nel sistema nervoso periferico, invece, è stata dimostrata, in uno studio precedente, un'espressione costitutiva di alcuni recettori TLR, in particolare TLR3, -4 e -7, anche nei neuroni dei plessi mienterici e sottomucosi dell'intestino murino adulto e dell'ileo e nei gangli sensitivi delle radici posteriori di uomo e topo adulti (Barajon, et al., 2009, Rumio, et al., 2006).

Recentemente, diversi studi hanno iniziato a mostrare che, analogamente a ciò che accade nella *Drosophila melanogaster*, i TLR potrebbero avere un ruolo cruciale nello sviluppo anche nei mammiferi. In particolare, l'espressione dei TLR è stata riscontrata a livello del sistema nervoso in via di sviluppo e in aree del sistema nervoso adulto in attiva neurogenesi (Cameron, et al., 2007, Lathia, et al., 2008, Ma, et al., 2006, Okun, et al., 2010, Rolls, et al., 2007, Shechter, et al., 2008). In particolare, i recettori TLR3 e TLR8 sono stati proposti come regolatori dello sviluppo assonale e

come induttori di apoptosi in neuroni embrionali del sistema nervoso centrale e periferico (Ma et al., 2006; Cameron et al., 2007).

Basandoci su tali dati e sulla conoscenza che in *Drosophila melanogaster* la proteina Toll, oltre a svolgere un ruolo immunitario nella fase adulta, gioca un ruolo fondamentale in molti aspetti morfogenetici, durante lo sviluppo embrionale, lo scopo della presente tesi di dottorato è stato, in primo luogo, quello di valutare lo schema temporale di espressione del recettore TLR4, che riconosce principalmente la componente LPS della parete esterna dei batteri Gram-negativi, e del TLR7, che lega l'RNA virale a singolo filamento, durante l'ontogenesi di importanti derivati nervosi della cresta neurale murina, in particolare dei gangli della catena paravertebrale, e di correlare questa espressione con markers di proliferazione e di differenziazione.

Dati ottenuti da linee di ricerca condotte parallelamente hanno evidenziato che il TLR4 e il TLR7 sono espressi con specifici patterns temporali durante lo sviluppo di altre strutture nervose periferiche murine, in particolare del sistema nervoso enterico e dei gangli sensitivi delle radici posteriori del midollo spinale.

Le reazioni di immunolocalizzazione condotte in questa prima fase del lavoro hanno inoltre rivelato positività per tali recettori anche in altro derivato della cresta neurale, la midollare del surrene, aprendo così una nuova linea di ricerca. Abbiamo, quindi, iniziato ad analizzare la finestra temporale d'espressione dei recettori TLR nelle diverse fasi di sviluppo del surrene murino.

Sono pochi gli studi presenti in letteratura sullo sviluppo del sistema nervoso, ma ancor meno quelli, finora, riguardanti l'espressione del TLR in organi viscerali. Ad oggi solo Tran e colleghi (2007), a nostra conoscenza, hanno rivelato mediante analisi immunoistochimica l'espressione del recettore TLR9 nel surrene di uomo durante lo sviluppo embrionale, in particolare nella regione corticale (e non in quella midollare) (Tran, et al., 2007).

Scopo di questa nuova linea di ricerca è stato quindi di investigare se, analogamente a quanto osservato per il sistema nervoso periferico, anche nel caso di organi parenchimatosi murini, quali surrene, pancreas e fegato, l'espressione del TLR7 e TLR4 potesse essere evidenziata già durante lo sviluppo embrionale e come quest'espressione continuasse negli organi adulti.

MATERIALI e METODI

1. Animali utilizzati

Il modello sperimentale adottato per il nostro studio prevede l'utilizzo di topi di circa tre mesi del ceppo CD-1 (Charles River, Calco, Italia) provenienti dallo stabulario della sezione di Anatomia Comparata e Citologia del Dipartimento di Biologia dell'Università degli Studi di Milano.

Gli animali vengono stabulati e lasciati acclimatare per una settimana, con cibo e acqua dati *ad libitum*. Le condizioni ambientali vengono mantenute costanti a temperatura di 22 °C e con un tasso di umidità pari al $55 \pm 5 \%$, alternando cicli di luce e buio di 12 ore.

2. Preparazione delle sezioni istologiche

2.1 Prelievo, fissazione e inclusione dei campioni

Per il nostro studio sono stati utilizzati embrioni a diversi stadi di sviluppo e topi adulti di entrambi i sessi.

L'accoppiamento prevede il trasferimento per una notte di quattro femmine in una gabbia con un maschio riproduttore. Il mattino seguente abbiamo verificato se l'accoppiamento fosse avvenuto, osservando la presenza di un tappo vaginale. Questo giorno è indicato come giorno 0 di gestazione (E0). Le femmine gravide vengono separate, pesate e distribuite nei diversi gruppi sperimentali. Per ognuna viene annotato il giorno d'inizio gravidanza ed il tipo di analisi a cui gli embrioni, estratti dall'utero, saranno sottoposti.



FIGURA 7: Embrioni di topo a diversi stadi di gestazione: E12, E14, E16 ed E18.

Raggiunto lo stadio di gestazione appropriato (E12, E14 e E16), le femmine vengono anestetizzate con etere e sacrificate tramite recisione delle arterie carotidi e aperte lungo la parete addominale utilizzando forbici chirurgiche (FIGURA 8).

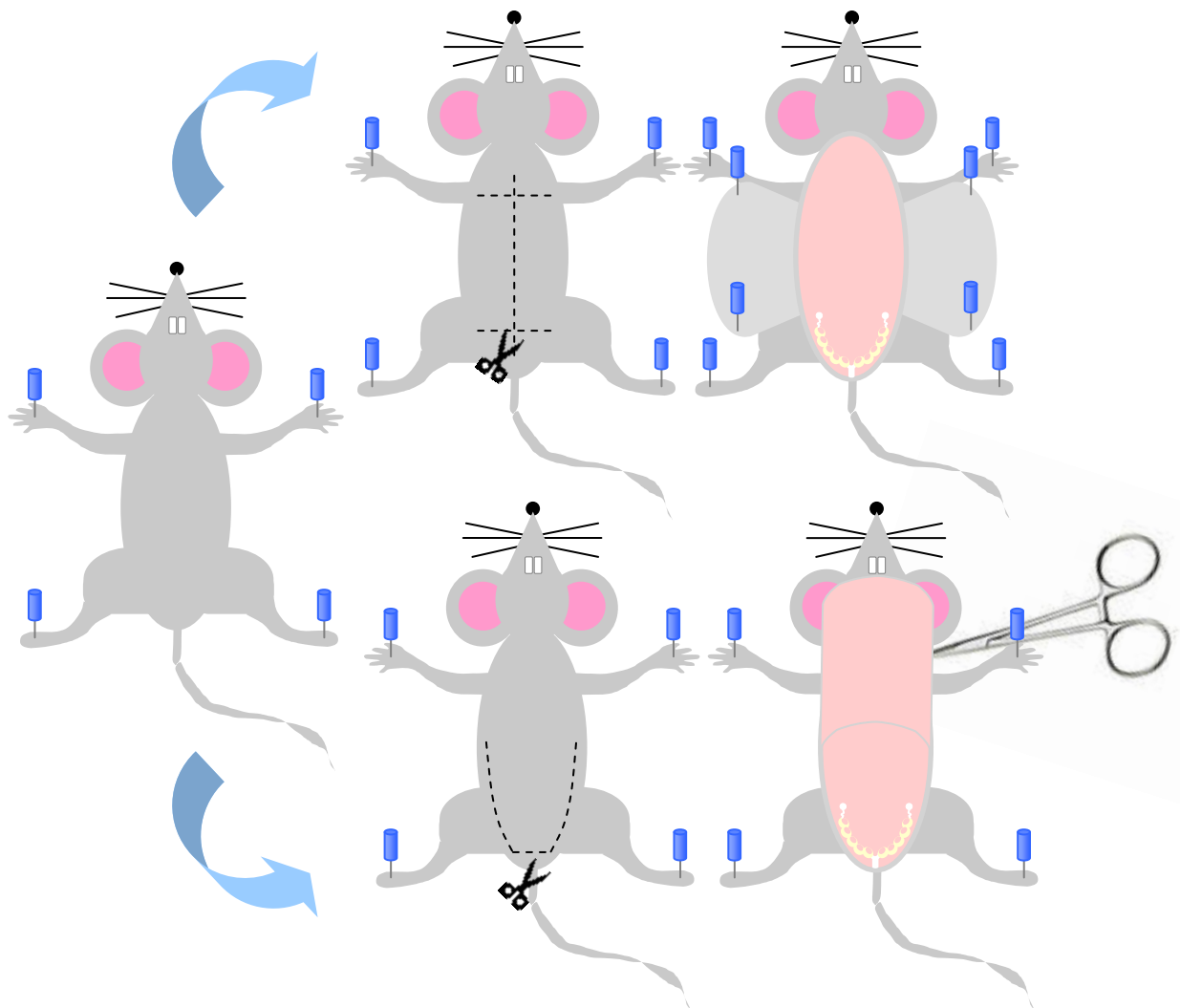


FIGURA 8: Rappresentazione schematica di due modalità di incisione della parete addominale per effettuare il prelievo dell'utero: si esegue una prima incisione addominale trasversale sopra pubica, una mediale/longitudinale fino alla cavità toracica dove si prosegue con un'altra incisione trasversale..

In seguito al sacrificio, l'utero è asportato *in toto* e posto in una capsula petri contenente soluzione fisiologica (NaCl 0,9 %) per uno sciacquo. Successivamente, l'utero viene disteso e gli embrioni vengono estratti uno ad uno dal sacco vitellino e liberati dagli annessi embrionali. Nel caso di embrioni al diciottesimo giorno *post-coitum*, che sarebbero in grado di sopravvivere, viene somministrata per via intraperitoneale una quantità aggiuntiva di anestetico, necessaria per il sacrificio.

Gli organi adulti (intestino, surrene, fegato e pancreas) vengono prelevati da topi di entrambi i sessi in seguito a sacrificio e vengono sciacquati in soluzione fisiologica.

Tutte le fasi del prelievo vengono effettuate rapidamente “a freddo”, tramite l'utilizzo di panetti di ghiaccio per diminuire la temperatura e rallentare così i processi di necrosi che si attivano dopo la morte dell'animale. Una volta prelevati, gli embrioni sono immediatamente fissati tramite un'iniezione intraperitoneale di paraformaldeide al 4 % in PBS (phosphate buffered saline; 0,1 M a pH 7,4) ed una breve immersione *in toto*, in modo tale che la soluzione fissativa arrivi subito agli organi interni.

I campioni sono poi divisi in parti a seconda dello stadio embrionale: gli embrioni E12 sono stati divisi in due parti (testa e corpo), mentre gli altri in tre (testa, arti superiori ed arti inferiori); e solo successivamente, immersi in fissativo a 4 °C per una notte. La riduzione dei campioni permette al fissativo di penetrare più velocemente nel tessuto. Anche gli organi adulti, precedentemente divisi in piccoli frammenti, sono stati fissati per immersione in paraformaldeide al 4 % in PBS. La riduzione dei campioni in piccole parti è necessaria per consentire al fissativo di penetrare uniformemente all'interno degli organi.

Dopo la fissazione i campioni sono lavati in PBS per eliminare il fissativo in eccesso, disidratati secondo una scala crescente di etanolo, diafanizzati con xilolo ed inclusi in paraffina dura (p.f. 56 °C; Merck KGaA, Germany).

Durante la preparazione dei campioni per l'inclusione in paraffina, i tempi di fissazione e di chiarificazione in xilolo possono variare in relazione alla dimensione del campione da includere.

In laboratorio sono state effettuate numerose prove di inclusione in modo da ottimizzare i tempi di fissazione, disidratazione, diafanizzazione e infiltrazione dell'embrione, cercando così di ottenere un preparato istologico ben conservato.

2.2 Sezionamento e montaggio delle sezioni istologiche

Dai campioni così ottenuti sono state tagliate sezioni di spessore compreso tra 4 µm e 6 µm, utilizzando un microtomo Leica RM 2155. Le sezioni istologiche sono state poi raccolte su vetrini porta oggetto Superfrost, precedentemente sottoposti al processo di xilanizzazione per garantirne un'adesione ottimale al vetrino. Infine, se non utilizzate subito, le sezioni vengono conservate in camera fredda ad una temperatura di 4 °C per un tempo massimo di un anno.

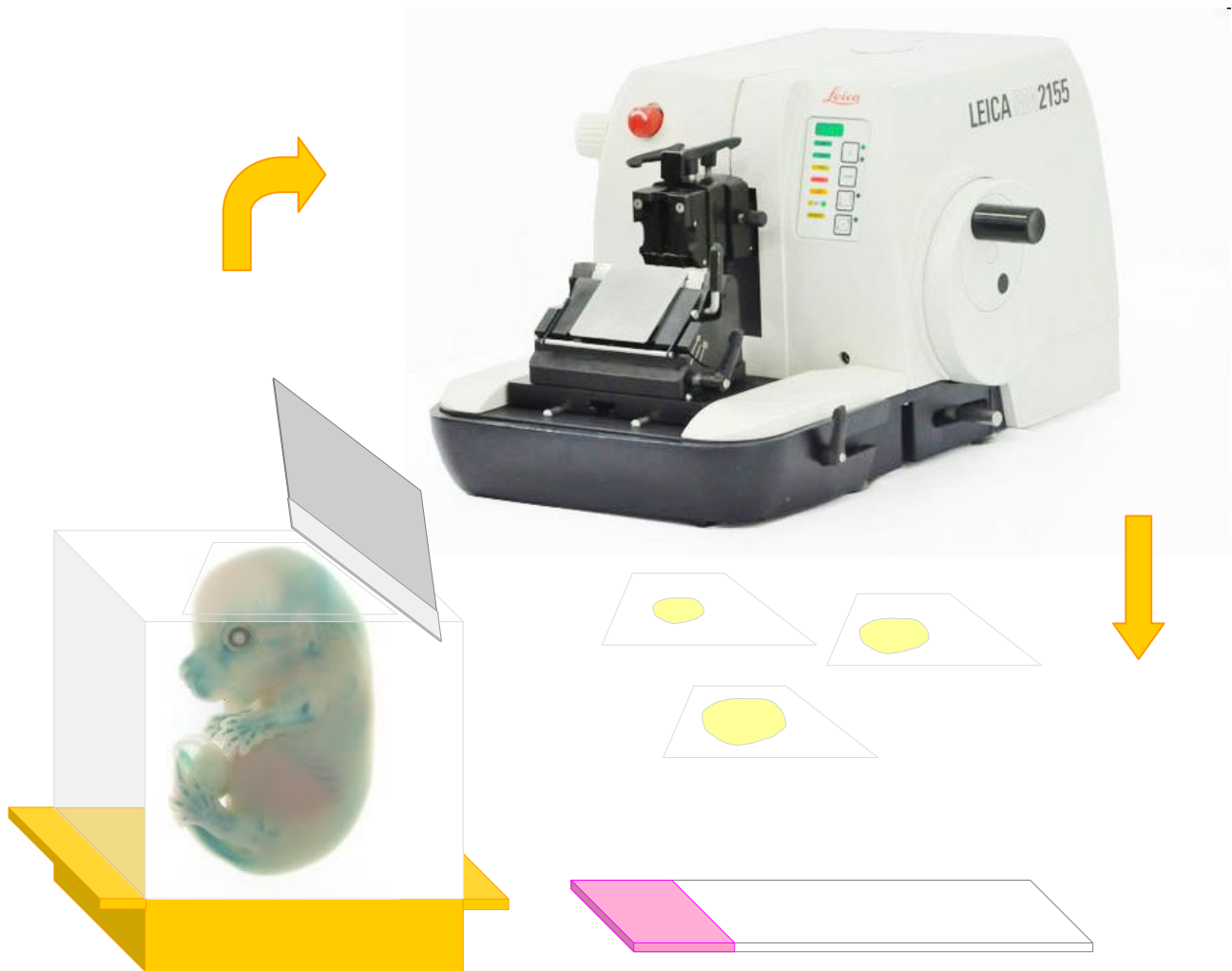


FIGURA 9: Rappresentazione schematica della fase di sezionamento e montaggio. I campioni inclusi in blocchetti di paraffina vengono tagliati al microtomo in sezioni istologiche, successivamente raccolte su vetrini xilanizzati.

3. Colorazioni istologiche

Per valutare il livello del campione lungo l'asse rostro-caudale ed il grado di conservazione del tessuto, sono state effettuate due diverse colorazioni istologiche: ematossilina-eosina e tricromica di Masson.

Le sezioni sono sottoposte a un protocollo che prevede una fase di sparaffinatura, reidratazione e colorazione:

3.1 Ematossilina Eosina

La colorazione con ematossilina-eosina è una colorazione combinata successiva costituita da due diversi coloranti solubili capaci di legarsi stabilmente a particolari tipi di cellule e strutture

citoplasmatiche particolari. L'ematossilina è un colorante basico che colora in blu violaceo il nucleo, invece l'eosina è un colorante debolmente acido che colora in varie tonalità di rosa la maggior parte delle strutture citoplasmatiche, il tessuto connettivo e la sostanza intercellulare.

Coloranti utilizzati:

- Ematossilina di Carazzi
 - Soluzione 1:
Sciogliere a caldo 25 g di Allume potassico ($\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) in 350 ml H_2O_d ; quando il sale si è sciolto, sospendere il riscaldamento ed aggiungere 0.5 g di Ematossilina.
 - Soluzione 2:
Sciogliere a freddo 0.1 g di Iodato potassico (KIO_3) in 50 ml di H_2O_d .
Quando la soluzione 1 si è raffreddata aggiungere la soluzione 2 e 100 ml di glicerina pura bidistillata. Si può aggiungere 1 g di sodio azide per evitare la formazione di muffe.
- Eosina
 - Soluzione madre:
Si prepara una soluzione all'1 % in H_2O_d partendo dalla polvere di eosina. Se necessario acidificare con qualche goccia di acido acetico.
 - Soluzione d'uso:
Al momento dell'uso si diluiscono 30 ml di soluzione madre in 100 ml di H_2O_d .

Protocollo:

- Sparaffinatura e Idratazione: stufa a 60 °C (30 minuti); xilolo (3 x 10 minuti); etanolo assoluto (2 x 5 minuti); etanolo 96 % (5 minuti); etanolo 80 % (5 minuti); etanolo 70 % (5 minuti); etanolo 50 % (5 minuti); H_2O_d (5 minuti)
- Passaggio in ematossilina di Carazzi (45 secondi)
- Viraggio in H_2O di fonte (2 minuti e 30 secondi)
- Passaggio le sezioni in Eosina (20 secondi)
- Disidratazione: etanolo 70 % (passaggio veloce); etanolo 80 % (passaggio veloce); etanolo 96 % (2 minuti), etanolo assoluto (2 x 5 minuti); xilolo (2 x 5 minuti)
- Montaggio con montante idrofobo (Entellan, Meck, Darmstadt, Germany)

3.2 Tricromica di Masson (Goldner, 1938)

La tricromica di Masson è un metodo che permette di colorare elettivamente le fibre collagene e consente quindi di differenziare il tessuto connettivo. E' una colorazione combinata successiva che prevede l'uso di tre coloranti: l'ematossilina ferrica di Weigert che conferisce al nucleo una colorazione rossa con granulosità grigio/nere, il ponceau/fucsina che colora di rosso il citoplasma, la cheratina, le fibre muscolari e i granuli acidofili, e il verde luce che dona alle fibre collagene una colorazione azzurro-verde.

Coloranti utilizzati:

- Ematossilina ferrocloridrica di Weigert

- Soluzione 1:

4 ml di percloruro di ferro al 48 % in H_2O_d , 1 ml di acido cloridrico, 95 ml di H_2O_d

- Soluzione 2:

1 g di ematossilina in 100 ml di alcool etilico 96 %

Tenere la soluzioni 1 al buio per circa 2 settimane per consentirne la maturazione, poi unirla alla soluzione 2 in un rapporto 1:1 (tenere la soluzione finale sempre al buio).

- Ponceau /Fucsina:

0.13 g di ponceau 2R, 0.06 g di fucsina acida, 200 ml di H_2O_d , 0.4 ml di acido acetico

- Acido Fosfowolframico, Orange G:

10 g di acido fosfowolframico, 4 g di orange G, 200 ml di H_2O_d

- Verde luce:

0.2 g di fast green FCF, 200 ml di H_2O_d , 0.4 ml di acido acetico

Protocollo:

- Sparaffinatura e Idratazione: stufa a 60 °C (30 minuti); xilolo (3 x 10 minuti); etanolo assoluto (2 x 5 minuti); etanolo 96 % (5 minuti); etanolo 80 % (5 minuti); etanolo 70 % (5 minuti); etanolo 50 % (5 minuti); H_2O_d (5 minuti)
- Immersione in ematossilina di Weigert (10 minuti)
- Differenziazione nella soluzione alcool/acido (CH_3CH_2OH/HCl) (passaggio veloce)
- Lavaggio in H_2O_d (passaggio veloce)
- Viraggio in H_2O di fonte corrente (10 minuti)
- Passaggio nel colorante ponceau/fucsina (5 minuti)
- Lavaggio in acido acetico 1 % in H_2O_d (3 minuti)

- Differenziazione con la soluzione mordenzante (acido fosfowolformico, orange G) (5 minuti)
- Lavaggio in acido acetico 1 % in H₂O_d (5 minuti)
- Passaggio nella soluzione verde-luce (5 minuti)
- Lavaggio in acido acetico 1 % in H₂O_d (5 minuti)
- Disidratazione: etanolo 96 % (2 minuti), etanolo assoluto (2 x 5 minuti); xilolo (2 x 5 minuti)
- Montaggio con Entellan.

4. Procedure di immunolocalizzazione

Reagenti utilizzati per l'immunoistochimica:

- Soluzione tampone Tris Buffered Saline (TBS, 1 M)
- Soluzione bloccante “supercarla” (Tris HCl 0.05M, NaCl 0.15M, gelatina allo 0.1%, ovalbumina allo 0.5%, tween20 allo 0.5% e gelatina di pesce allo 0.2%)
- Anticorpi primari: rabbit anti-mouse TLR4 (policlonale; Imgenex), rabbit anti-mouse TLR7 (policlonale; Imgenex), mouse anti-mouse β 3-tubulina (monoclonale, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticorpo secondario: goat anti-rabbit (policlonale; Sigma)
- Perossidasi anti-perossidasi: PAP rabbit (Sigma)
- Diaminobenzidina liquida (DAB; DakoCytomation) utilizzata per lo sviluppo delle reazioni di immunoistochimica
- MOM Kit (Mouse Primari Antibodies On Mouse Tissue, Vector Laboratories Burlingame, CA), attenendoci alle informazioni fornite dalla casa produttrice
- montante idrofobo (Entellan, Meck, Darmstadt, Germany).

4.1 Protocolli di immunoistochimica (TLR4 e TLR7)

Per indagare la localizzazione dei recettori TLR4 e TLR7 abbiamo eseguito i seguenti protocolli.

Inizialmente le sezioni sono sottoposte alle fasi di sparaffinatura e reidratazione che prevedono i seguenti passaggi:

- Stufa a 60 °C per 30 minuti
- Passaggio in xilolo per 10 minuti (3 volte)

- Passaggio in etanolo assoluto per 5 minuti (3 volte)
- Passaggio in scala discendente di etanolo: 96 %, 80 %, 70 %, 50 % per 5 minuti ognuno
- Passaggio in H₂O_d per 5 minuti

Per ottenere lo smascheramento dei siti di legame e permettere così all'anticorpo specifico di riconoscere facilmente l'epitopo a cui legarsi, le sezioni, sulle quali verrà effettuata l'immunolocalizzazione per il TLR4, sono poste in autoclave a 120 °C per 6 minuti mentre, quelle sulle quali verrà saggiata la presenza del recettore TLR7, sono messe in microonde e sottoposte a tre cicli alla massima potenza da 4 secondi l'uno interponendo un minuto di pausa tra un ciclo e l'altro. In entrambi i metodi viene usata una soluzione tampone (tampone citrato 0.01 M a pH 6) in cui immergere le sezioni.

Dopo aver atteso il raffreddamento del campione, le sezioni vengono sottoposte processate con la tecnica dell'immunoistochimica secondo il seguente protocollo:

- Lavaggio in TBS
- Quenching delle perossidasi endogene in una soluzione di acqua ossigenata (H₂O₂) allo 0.3 % in TBS per 20 minuti a temperatura ambiente al buio
- Lavaggi in TBS di 5 minuti (3 volte)
- Incubazione con la soluzione bloccante descritta sopra per 30 minuti a temperatura ambiente
- Incubazione con l'anticorpo primario: rabbit anti-mouse TLR4 diluito 1:50 in TBS overnight a 4 °C o rabbit anti-mouse TLR7 diluito 1:100 in TBS a 38°C per 1 ora e overnight a 4 °C
- Lavaggi in TBS di 5 minuti (3 volte)
- Incubazione con l'anticorpo secondario: goat anti-rabbit diluito 1:100 in supercarla per il TLR4 e in TBS per il TLR7 per 1 ora a temperatura ambiente
- Lavaggi in TBS di 5 minuti (3 volte)
- Incubazione con PAP rabbit diluita 1:100 nella soluzione bloccante per il TLR4 e in TBS per il TLR7 per 1 ora a temperatura ambiente
- Lavaggi in TBS di 5 minuti (3 volte)
- Sviluppo con DAB
- Lavaggio in H₂O_d
- Controcolorazione con ematossilina di Carazzi per 45 secondi
- Risciacquo del campione sotto H₂O corrente per 3 minuti
- Disidratazione attraverso una scala ascendente di etanolo: 50 %, 70 %, 80 %, 96 % per 5 minuti ciascuno
- Passaggio in etanolo assoluto per 5 minuti (2 volte)

- Passaggio in xilolo per 5 minuti (2 volte)
- Montaggio con Entellan

Per verificare la specificità della reazione si effettua un controllo negativo: alcune sezioni vengono sottoposte allo stesso protocollo sostituendo l'anticorpo primario con la nostra soluzione tampone (TBS). Inoltre, si utilizzano sezioni di intestino di topo adulto come controllo positivo per verificare che la reazione sia avvenuta correttamente, data la comprovata espressione dei recettori TLR4 e TLR7 a livello del plesso mienterico e sottomucoso dell'intestino adulto.

Reagenti utilizzati per l'immunofluorescenza:

- Soluzione tampone Tris Buffered Saline (TBS) / (Albumin bovine serum) BSA 1 %
- Soluzione per eliminare l'autofluorescenza: Sodio boro idruro (NaBH_4) in TBS
- Bloccante: Goat Serum (Dakocytomation)
- Anticorpi primari: rabbit anti-mouse TLR4 (policlonale, Novus Biologicals); rabbit anti-mouse TLR7 (policlonale, Imgenex); mouse anti-PGP9.5 (Protein gene product 9.5, Novocastra, Laboratories LTd); mouse anti-mouse PCNA (Proliferating cell nuclear antigen, Santa Cruz Biotechnology)
- Anticorpo secondario : goat anti-rabbit FITC (Santa Cruz Biotechnology)
- TRITC- coniugated Streptavidin (Jackson Laboratories, West Grove, PA)
- Dapi (Sigma, Santa Louis Missouri, USA)
- Montante idrofilo (Mowiol, Sigma)(2.4 g di Mowiol diluito in H_2O_d , soluzione Tris 0.2 M, glicerolo)
- M.O.M. Kit (Vector Laboratories Burlingame, CA) attenendoci alle informazioni fornite dalla casa produttrice.

4.2 Protocolli di Immunofluorescenza doppia (TLR4 o TLR7 e PCNA o PGP 9.5)

Reazioni di doppia immunofluorescenza sono state eseguite per valutare la colocalizzazione dei recettori TLR4 e TLR7 con un marker pan-neuronale specifico, PGP9.5, e con un marker neuronale specifico per la proliferazione, PCNA, per verificare rispettivamente se le cellule positive per il TLR4 e TLR7 siano effettivamente cellule neurali e se la loro espressione avvenga durante la fase proliferativa oppure durante la differenziazione cellulare in senso neurale o gliale.

I campioni sono sottoposti agli stessi metodi di sparaffinatura, reidratazione e smascheramento dei siti di legame descritti precedentemente per la reazione di immunoistochimica.

Successivamente, le sezioni sono processate secondo il seguente protocollo:

- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- NaBH₄ in TBS per 10 minuti in ghiaccio (tre volte)
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- Incubazione con soluzione bloccante goat serum 1:10 in TBS/BSA 1 % per 30 minuti a temperatura ambiente
- Incubazione con anticorpo primario: rabbit anti-mouse TLR4 diluito 1:50 in TBS/BSA 1 % per 1 ora a 37 °C e poi overnight a 4 °C o rabbit anti-mouse TLR7 diluito 1:50 in TBS/BSA 1 % per 1 ora a 37 °C e poi overnight a 4 °C.
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- Incubazione con anticorpo secondario: goat anti-rabbit FITC 1:200 in TBS/BSA 1 % per 1 ora a temperatura ambiente
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- Incubazione con lo specifico bloccante contenuto nel M.O.M. Kit per 1 ora a temperatura ambiente
- Incubazione con anticorpo primario: mouse anti-mouse PCNA 1:100 o mouse anti-mouse PGP9.5 1:20 nella soluzione tampone del M.O.M. Kit per 1 ora a 37 °C
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- Incubazione con anticorpo secondario biotinilato presente nel M.O.M. Kit per 10 minuti a temperatura ambiente
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- Incubazione con Steptavidina 1:100 in TBS/BSA 1 % per 30 minuti a temperatura ambiente
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (tre volte)
- Dapi 1:300000 per 5 minuti a temperatura ambiente
- Lavaggi in TBS/BSA 1 % per 5 minuti (due volte)
- Lavaggio in H₂O_d per 5 minuti
- Montaggio con Mowiol.

Le sezioni di controllo negativo sono state trattate come sopra omettendo entrambi gli anticorpi primari ed incubandole solo con la soluzione tampone in cui viene diluito l'anticorpo primario.

4.3 Osservazione delle sezioni istologiche

I preparati ottenuti mediante le reazioni di immunolocalizzazione o le colorazioni istologiche sono stati osservati tramite il microscopio ottico Nikon Eclipses 80i (FIGURA 10), collegato ad una fotocamera digitale e ad un computer che permettono l'acquisizione delle immagini digitali tramite il software ACT-ZU.

Per la valutazione dei campioni in fluorescenza sono stati utilizzati specifici set di filtri (FITC: EX 465-495 / DM 509 / BA 515-555; TRITC EX 540-525 / DM 165 / BA 605-655). Le immagini sono poi state elaborate mediante il programma Adobe Photoshop CS4.

Il processo di rielaborazione delle immagini digitali non prevede alcun tipo di artefatto o di modificazione dell'immagine, ma soltanto in una regolazione dei livelli dei colori (RGB) per migliorare la nitidezza della marcatura.



FIGURA 10: Microscopio Nikon Eclipses 80i.

RISULTATI

1. Espressione dei recettori TLR4 and TLR7 in gangli paravertebrali durante lo sviluppo embrionale:

Dati ottenuti dai campioni inclusi in paraffina dimostrano che entrambi i recettori Toll-like iniziano ad essere espressi nei gangli paravertebrali durante lo sviluppo embrionale.

Per quanto riguarda il recettore TLR7, già a partire dallo stadio embrionale E12 è possibile osservare una debolissima immunoreattività in pochi neuroni dei gangli paravertebrali (PVG) (Tavola II, figura A), mentre la marcatura per il recettore TLR4 inizia ad essere visibile a questo livello soltanto due giorni più tardi, a E14 (Tavola II, figura B).

Sin dall'inizio della loro espressione, TLR4 e -7 presentano una marcatura citoplasmatica dei corpi cellulari, spesso associata per il TLR7 ad una marcatura perinucleare ed a volte nucleare. In entrambi i casi risultano essere chiaramente immunoreattive anche le fibre nervose che originano dai gangli (Tavola II, figura E, F).

Con il progredire della gestazione la marcatura per il TLR4 e TLR7 aumenta di intensità.

Negli stadi embrionali più tardivi, entrambi i recettori risultano chiaramente espressi in tutti i neuroni dei PVG (Tavola II, figura C, D). Il TLR4 inoltre presenta una forte immunoreattività in tutti i neuroni di piccole dimensioni in confronto a quelli di grandi dimensioni nei quali è visibile una marcatura di minor intensità (Tavola II, figura C).

Le reazioni di doppia immunofluorescenza confermano i dati ottenuti dalle reazioni di immunoistochimica.

Per verificare se i recettori TLR7 e TLR4 localizzati a livello dei neuroni dei gangli paravertebrali esprimessero già marker pan-neuronali, abbiamo eseguito esperimenti di doppia immunofluorescenza con il marker pan-neuronale PGP9.5. I risultati ottenuti mostrano che tutte le cellule dei gangli paravertebrali positive per i recettori TLR7 (Tavola III, figura C) e TLR4 (Tavola III, figura F) sono neuroni che esprimono già marker pan-neuronali.

Al fine di valutare se le cellule che esprimevano il TLR7 e il TLR4 erano ancora in proliferazione, reazioni di doppia immunofluorescenza con il marker di proliferazione cellulare PCNA sono state eseguite su sezioni di embrioni allo stadio E12 (PCNA/TLR7) ed E14 (PCNA/TLR4). Solo alcune cellule positive per i recettori TLR4 (Tavola IV, figura C) o TLR7 (Tavola IV, figura F) risultano essere marcate anche per il PCNA. La marcatura per i recettori TLR risulta visibile anche in altri gangli ortosimpatici, quali i gangli preaortici ed i gangli renali (Tavola II, figura G; Tavola III, figura I).

2. Espressione dei recettori TLR4 and TLR7 in surrene, fegato e pancreas adulti e durante lo sviluppo embrionale:

Gli esperimenti di immunoistochimica su campioni inclusi in paraffina evidenziano che i recettori TLR4 e TLR7 iniziano ad essere espressi a livello di surrene, fegato e pancreas durante lo sviluppo embrionale e proseguono negli organi adulti.

2.1 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel surrene durante lo sviluppo embrionale murino

Analizzando le sezioni di embrioni a diversi stadi di sviluppo, è stato possibile osservare che l'espressione dei recettori TLR4 e TLR7 compare nel primordio del surrene (*corticale embrionale*) già a partire dallo stadio E12. Per entrambi i recettori abbiamo riscontrato la presenza di immunoreattività in gruppi di cellule disposte medialmente rispetto alle gonadi, tra mesonefro ed aorta, con diversa localizzazione intracellulare: citoplasmatica per il TLR4 (Tavola V, figura B) e perinucleare per il TLR7 (Tavola V, figura C). A partire dallo stadio E14, la marcatura risulta più intensa nella zona sottostante la capsula e si estende al primordio della midollare che ha fatto la sua comparsa (Tavola V, figura E, F). A E16 appaiono chiaramente marcate alcune cellule sparse nella *midollare embrionale* (Tavola V, figura H, I).

2.2 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel surrene di topo adulto

I dati presentati in questa tesi mostrano che i recettori TLR4 e TLR7 sono espressi nella capsula connettivale, nella regione corticale e in quella midollare del surrene di topo adulto.

Per quanto riguarda la regione *corticale*, i due recettori risultano principalmente espressi nella zona glomerulare, ossia la zona più superficiale, e mostrano una progressiva diminuzione verso la zona reticolare, ossia la zona più profonda (Tavola VI, figura B, C). La marcatura per il TLR4 nella regione corticale è localizzata sia a livello del nucleo che del citoplasma e in quest'ultimo ha un aspetto granulare (Tavola VI, figura E, H, M). La marcatura per il TLR7 sembra essere principalmente perinucleare (Tavola VI, figura F, I, N).

Frequentemente, tra la zona reticolare e la regione midollare, è possibile osservare noduli di cellule immunoreattivi immersi in tessuto connettivo, che rappresentano la zona-X in regressione (Beuschlein et al., 2003). I recettori TLR4 e TLR7 risultano espressi in maniera diffusa nel

citoplasma in cui sono presenti vescicole più intensamente marcate (Tavola VI, figura M, N). Il TLR7 è inoltre presente nelle cellule connettivali a livello perinucleare (Tavola VI, figura N).

Per quanto riguarda la regione *midollare*, la marcatura per il TLR4 sembra essere in generale più intensa rispetto al TLR7 e di natura sia nucleare che citoplasmatica. Nel citoplasma la marcatura ha un aspetto granulare. E' possibile inoltre osservare che alcune aree sono più fortemente reattive (Tavola VI, figura P).

In generale, il TLR7 marca debolmente il citoplasma di alcune cellule midollari. Tuttavia sono anche intensamente reattive cellule sparse e fibre di probabile natura nervosa (Tavola VI, figura Q). Alcune analisi immunoistochimiche hanno mostrato un'intensa marcatura perinucleare per il recettore TLR7 in uno strato di cellule sottocapsulari, di forma schiacciata ed irregolare, che sembrano emergere dalla capsula, avvolgere la zona glomerulare ed infiltrarsi all'interno della regione corticale (Tavola VII, figura B, D). Tale zona sottocapsulare non presenta, invece, alcuna marcatura per il recettore TLR4 (Tavola VII, figura A, C).

2.3 Espressione di recettori TLR4 e TLR7 nel pancreas durante lo sviluppo embrionale murino

I recettori TLR4 e TLR7 risultano presenti a partire dallo stadio E12 nelle cellule del primordio ventrale e dorsale del pancreas. Il recettore TLR4 comincia ad essere visibile a questo stadio in quasi tutte le cellule con una marcatura citoplasmatica (Tavola VIII, figura B), mentre il TLR7 è espresso nella regione perinucleare di un numero limitato di cellule (Tavola VIII, figura C). A E14 l'espressione del TLR4 si concentra nella regione apicale delle cellule degli acini in via di differenziamento (Tavola VIII, figura E). La marcatura per il TLR7 si estende a quasi tutte le cellule del primordio. In particolare, la regione in cui sono presenti i dotti escretori in formazione e le cellule endocrine risulta più fortemente reattiva della regione in cui si trovano gli acini (Tavola VIII, figura F). Con il progredire dello sviluppo (E16), la marcatura del TLR4 rimane localizzata nella regione apicale delle cellule acinose (Tavola VIII, figura H). Invece, l'immunoreattività per il TLR7 rimane chiaramente visibile solo nelle cellule che andranno a definire i dotti escretori e le isole di Langerhans con marcatura perinucleare e citoplasmatica. Sono inoltre intensamente marcate per il TLR7 fibre nervose e gruppi di cellule di probabile natura nervosa (Tavola VIII, figura I).

2.4 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel pancreas di topo adulto

Dall'analisi immunoistochimica del pancreas adulto è emerso che entrambi i recettori sono espressi sia nella componente endocrina che in quella esocrina (Tavola IX, figura B, C). Nel caso di quest'ultima, l'immunoreattività per il TLR7 è visibile solo in alcune zone, in cui risulta marcata la porzione basale delle cellule acinose con gradi diversi di marcatura (Tavola IX, figura F). Invece, il TLR4 appare chiaramente espresso sia nel nucleo e che nella porzione basale di quasi tutte cellule esocrine (Tavola IX, figura E). Risulta inoltre marcato sia per il TLR7 (Tavola IX, figura N) che per il TLR4 il citoplasma (Tavola IX, figura M) dei dotti escretori. Nel caso delle isole endocrine (isole di Langerhans), la marcatura per entrambi i recettori è visibile in tutte le cellule dell'organo (Tavola IX, figura H, I). Inoltre, il nucleo delle cellule centroacinose risulta immunoreattivo per il TLR7 (Tavola IX, figura F), mentre il TLR4 è presente in alcune cellule endoteliali dei vasi (Tavola IX, figura H).

2.5 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel fegato durante lo sviluppo embrionale murino

A partire dallo stadio E12, osservando l'immunoistochimica per il TLR4 appaiono marcati il nucleo ed il citoplasma di cellule di probabile natura epatoblastica che appaiono particolarmente addensate soprattutto addensate alla periferia dell'organo. Invece, non risultano immunoreattivi gruppi di cellule sparsi nel primordio del fegato di probabile natura eritroblastica. Appare inoltre marcato il citoplasma di megacariociti in via di differenziamento (Tavola X, figura B). Il TLR7 è espresso in gruppi di cellule con la stessa distribuzione. La marcatura risulta però meno intensa e localizzata nel citoplasma. Fortemente reattivi risultano invece i megacariociti (Tavola X, figura C). Allo stadio E14, la marcatura è sempre presente nei megacariociti ed il numero di cellule marcate, probabilmente epatociti e colangiociti in via di differenziamento, aumenta ed è possibile notare un loro maggiore addensamento anche intorno alle vene centrolobulari (Tavola X, figura H, I). Allo stadio E16 è possibile osservare una diminuzione della marcatura (Tavola X, figura M, N).

2.6 Espressione dei recettori TLR4 e TLR7 nel fegato di topo adulto

L'analisi immunoistochimica sul fegato di topo adulto ha evidenziato che il nucleo e il citoplasma degli epatociti intorno alle vene centrolobulari risultano fortemente reattivi per il TLR4 e che la marcatura diminuisce di intensità spostandosi verso la periferia del lobulo (Tavola XI, figura B).

All'interno dei sinusoidi epatici è chiaramente marcato il citoplasma delle cellule di Kupffer (Tavola X, figura H) e a livello degli spazi portalì è possibile osservare un'intensa marcatura delle cellule epiteliali dei dotti biliari (Tavola X, figura M). Il recettore TLR7 è espresso nel citoplasma delle cellule di Kupffer (Tavola X, figura I), nella porzione perinucleare degli epatociti che si trovano vicino alle vene centrolobulari (Tavola X, figura F) e nelle cellule epiteliali dei dotti biliari con marcatura citoplasmatica e nucleare (Tavola X, figura N).

TAVOLE

DISCUSSIONE

1. Espressione di TLR4 e TLR7 in gangli paravertebrali murini embrionali

La cresta neurale dei vertebrati è costituita da una popolazione transitoria totipotente di cellule staminali da cui originano l'intero SNP e cellule e tessuti di natura non nervosa. L'enorme range di tipi cellulari derivati da questa singola regione embrionale è un'importante ragione per considerare la cresta neurale come un 4° foglietto germinativo. Le cellule della cresta neurale (NCC) si formano durante il processo di neurulazione.

Quando le NCC sono ancora associate al tubo neurale sono esposte a diversi segnali che forniscono informazioni per la restrizione del destino o la specificazione di un particolare fenotipo: le cellule della cresta che inizialmente presentano le caratteristiche di cellule epiteliali, vanno incontro ad una transizione epitelio-mesenchimale che determina un elevato grado di riorganizzazione citoscheletrica, una down-regolazione di alcune caderine, cambiamenti nel piano di divisione cellulare, cambiamenti nelle interazioni cellula-cellula, cellula-matrice e di alcune proprietà di adesione cellulare che portano queste cellule ad avere un'elevata capacità di movimento. La lamina basale intorno al tubo si dissolve temporaneamente e le cellule così formate lasciano il tubo neurale tra E8.5 e E10-E10.5 nel topo. Una volta fuori dal tubo neurale le cellule della cresta migrano ed invadono gli altri tessuti. Le cellule della cresta neurale presentano quindi caratteristiche non diverse dalle cellule tumorali, con la loro capacità invasiva unita alla loro capacità di realizzare interazioni intercellulari e tissutali. Le NCC migrano attraverso il corpo e proliferano allo stesso tempo. Infine, quando raggiungono la loro sede definitiva, in svariate regioni del corpo, differenziano in molti diversi tipi cellulari. Questi fattori (transizione epitelio-mesenchimale, riorganizzazione citoscheletrica, down-regolazione di alcune caderine, cambiamenti nel piano di divisione cellulare, cambiamenti nelle interazioni cellula-cellula, cellula-matrice e di alcune proprietà di adesione cellulare) giocano tutti un ruolo importante nella migrazione delle NCC

La prima ondata migratoria porta le cellule ventralmente tra i somiti ed il tubo neurale. Poi si dirigono verso la metà rostrale di ogni sclerotomo, dove molte NCC si differenzieranno in neuroni sensitivi. Altre NCC continuano a migrare verso l'aorta dorsale e diventeranno neuroni postsinaptici e glia del SNA (gangli simpatici, midollare del surrene e nervi intorno all'aorta). Una seconda ondata migratoria dorsolaterale porta le NCC tra il dermamiotomo e l'ectoderma, queste cellule si differenzieranno in melanociti.

I gangli simpatici, insieme a quelli parasimpatici ed alle cellule cromaffini della midollare del surrene, derivano da progenitori multipotenti della cresta neurale che migrano centralmente lungo lo stesso pathway segmentato attraverso i somiti come la linea sensitiva, ma non si fermano finchè non raggiungono l'aorta dorsale. Queste cellule formano inizialmente una catena simpatica continua che si svilupperà in rigonfiamenti distinti andando a formare così la catena simpatica primaria, che comprende un pool di precursori per le cellule della midollare del surrene, gangli prevertebrali e gangli della catena secondaria o paravertebrale. Da qui, queste cellule si disperdono dorsalmente formando la catena simpatica secondaria o ventralmente verso il rene dove contribuiranno allo sviluppo del surrene.

I dati ottenuti indicano che il recettore TLR7 inizia ad essere debolmente espresso piuttosto precocemente, già a partire dal primo stadio embrionale da noi studiato, E12, mentre il TLR4 fa la sua prima comparsa soltanto due giorni più tardi, a E14. Col progredire della gestazione, la marcatura per il TLR4 ed il TLR7 aumenta d'intensità.

Come dimostrato dai risultati ottenuti dalle reazioni di doppia immunofluorescenza con il marker pan-neuronale PGP9.5, l'espressione di entrambi i recettori è presente in tutte le cellule dei gangli paravertebrali che si stanno differenziando in senso neuronale.

Nei gangli paravertebrali murini, la maggior parte dei neuroni esce dal ciclo cellulare tra E12 e E18 (Hendry, 1977; Landis and Damboise, 1986), anche se un piccolo numero di neuroni sembra continuare a dividersi fino alla fine della prima settimana dopo la nascita.

Considerando la sovrapposizione dell'espressione dei TLR da noi osservata con la finestra proliferativa dei PVG, sono state eseguite delle reazioni di colocalizzazione con il marker di proliferazione PCNA. Tali reazioni hanno dimostrato che alcune cellule esprimenti i TLR sono ancora in proliferazione. Questo dato si discosta da dati precedenti del nostro laboratorio sull'espressione dei TLR nel sistema nervoso enterico (ENS) e nei gangli sensitivi (DRG) in via di sviluppo che evidenziavano invece che le cellule in fase di differenziazione neuronale presenti in queste sedi ed esprimenti TLR4 e -7 non colocalizzavano con il marker di proliferazione. Sulla base delle osservazioni pregresse nell'ENS e nei DRG e di queste nuove osservazioni sui gangli paravertebrali sembrerebbe consistente affermare che, sebbene nella maggior parte delle cellule nervose di derivazione dalla cresta neurale l'espressione dei TLR sia una caratteristica delle cellule postmitotiche che esprimono marker di differenziazione pan-neuronale, l'uscita dal ciclo replicativo non sia un prerequisito per tale espressione.

La maggior parte dei dati circa il ruolo dei TLR nella regolazione della proliferazione e differenziazione delle cellule del sistema nervoso riguarda il sistema nervoso centrale

Dati in letteratura hanno dimostrato un ruolo rilevante dei recettori TLR e dei loro mediatori di segnale durante il processo di proliferazione e differenziazione delle cellule precursori neuronali (NPC) nel sistema nervoso adulto ed embrionale dei mammiferi.

L'attivazione dei recettori TLR2, -3 e -4 ha dimostrato avere azione inibitoria sulla proliferazione delle NPC, probabilmente senza azione di ligandi esogeni, nella zona sottoventricolare del ventricolo laterale, nella zona sottogranulare del giro dentato dell'ippocampo e nella corteccia murina adulta e/o embrionale (Lathia et al., 2008, 36-38 di okun 2011).

Anche la proliferazione delle cellule precursori della retina risulta diminuita dall'attivazione del recettore TLR3 (Shechter et al., 2008).

L'attivazione e la delezione dei TLR ha anche effetto sul processo di differenziazione. Una ridotta espressione del TLR2 determina una riduzione nell'espressione dei marker pan-neuronali e un aumento dell'espressione di marker astrocitici nelle NPC, mentre la sua attivazione aumenta la differenziazione in senso neuronale. Al contrario, una ridotta espressione del TLR4 aumenta la differenziazione neuronale (Rolls et al., 2007).

Una possibile spiegazione circa l'espressione di TLR da noi osservata nei gangli simpatici e in altre sedi del sistema nervoso periferico in via di sviluppo potrebbe essere correlata ad interazioni con componenti della matrice extracellulare.

I processi di migrazione, proliferazione e differenziazione delle NPC sono fortemente regolati da interazioni con differenti cellule o tessuti attraverso i quali le NPC migrano e si stabilizzano prendendo contatto con elementi della matrice extracellulare (Rauch and Schäfer, 2003, Tsang et al, 2010).

Nel cosiddetto "*surveillance model*" circa l'evoluzione dei TLR, viene postulato che questi recettori si siano evoluti non solo per riconoscere molecole esogene ma anche prodotti di degradazione di macromolecole endogene che si formano sia durante processi infiammatori / immunitari / riparativi, che durante il rimaneggiamento tessutale presente nei processi di sviluppo embrionale (Johnson, 2003). Dati in letteratura hanno dimostrato per esempio che i TLR sono in grado di legare prodotti di degradazione dei proteoglicani, acido ialuronico ed heparan solfato (Schaefer et al., 2005; Iozzo and Schaefer, 2010, Brunn, 2005; Johnson, 2002) ed è noto che alcuni di questi prodotti sono per esempio coinvolti nella guida dei processi assonali (Conway et al., 2011).

L'espressione dei TLR osservata in questo studio e nei nostri studi precedenti in ENS e DRG non è limitato solo ai corpi cellulari, ma è anche presente nei neuriti, seguendone le modificazioni durante lo sviluppo. L'allungamento dei neuriti e il corretto assemblamento del sistema nervoso si basa sulla presenza di strutture ricche di actina, i coni di crescita, che sono considerati strutture sensoriali

mobili che sondano l'ambiente alla ricerca di fattori molecolari, tra cui quelli derivati dalla matrice extracellulare, per guidare e dirigere i neuriti (Dickson, 2002).

Cameron e colleghi hanno dimostrato che il TLR3 risulta localizzato a livello del cono di crescita dei neuriti che si stanno estendendo in vitro e che il ligando sintetico del TLR3 poly:IC causa una grande diminuzione dell'allungamento dei neuriti e provoca il collasso del cono di crescita. Questo risultato indica chiaramente che i ligandi endogeni dei TLR potrebbero avere effetto sul destino del *pathfinding* del cono di crescita.

Ma e colleghi hanno evidenziato che l'attivazione del TLR8 era in grado di inibire l'allungamento dei neuriti. E' interessante notare che nel processo di *pathfinding* assonico e di formazione sinaptica tra motoneuroni e cellule muscolari di *Drosophila*, la proteina Toll è localizzata su queste ultime.

Il collasso del cono di crescita osservato da Cameron trova un parallelo nel collasso dei podociti osservato nelle cellule dendritiche in seguito all'attivazione di alcuni recettori TLR, tra cui il TLR4. Le cellule dendritiche sono cellule del sistema immunitario che estendono strutture ricche di actina, i podociti, nell'ambiente circostante a fini motori, sensitivi e adesivi, interagendo strettamente con la proteine ECM. Quando esposti ai ligandi dei TLR, le cellule dendritiche vanno incontro a maturazione morfologica che include la riorganizzazione del citoscheletro e del sistema vacuolare, l'aumento dei contatti focali, il collasso dei podosomi e la perdita temporanea della capacità migratoria.

Come il cono di crescita, i podosomi sono in grado di degradare proteine ECM grazie all'azione delle metalloproteasi, che risulta ridotta dall'attivazione del TLR.

L'effetto confrontabile dell'attivazione dei TLR su strutture cellulari simili, ma appartenenti a tipi cellulari altrimenti diversi dal punto di vista funzionale e istotipico (cellule dendritiche e cellule nervose) supporta l'ipotesi che i TLR siano recettori sentinella coinvolti sia nella risposta immunitaria che nello sviluppo (Johnson, 2003).

2. Dal surrene embrionale al surrene adulto

Il surrene è un organo endocrino composto da due tessuti distinti per funzione e sviluppo. Mentre la corticale si sviluppa dalla cresta urogenitale e produce ormoni steroidei, le cellule cromaffini della midollare derivano dalla cresta neurale e sintetizzano e rilasciano catecolamine: adrenalina e noradrenalina, insieme ad una grande quantità di ormoni peptidici. Cellule cromaffini e neuroni simpatici si ritiene derivino da un progenitore simpatoadrenergico comune (SA), che si sviluppa in prossimità dell'aorta dorsale in risposta al segnale locale indotto dalle *bone-morphogenetic-protein*

(BPM). Successivamente, è stato ipotizzato che le cellule SA migrino alla loro destinazione finale, dando origine ai gangli simpatici ed al surrene (Lohr, et al., 2006).

A partire dallo stadio E12 si può osservare il primordio della *corticale*, costituito da gruppi di cellule di origine mesenchimale, poste immediatamente sopra il peritoneo, nella regione compresa tra l'aorta dorsale e i tubuli del mesonefro (H. Waring M.Sc., 1935). A partire dallo stadio E13 inizia a formarsi una capsula connettivale che separerà il primordio della corticale dal mesenchima circostante. Dallo stadio E14, cellule simpato-cromaffini, provenienti dalla cresta neurale, migrano al centro del primordio della corticale e possono trovarsi isolate o in nidi di cellule disposti irregolarmente, che corrispondono alle “rosette” descritte da Pankratz nel ratto e da Keene e Hewer nell'uomo. Diversamente da Waring, altri autori fanno cominciare l'infiltrazione delle cellule simpato-cromaffini tra E12.5 e E13.5. Queste cellule formeranno in seguito la regione *midollare* del surrene adulto. A partire da questo stadio si possono osservare varie fibre nervose che corrono in profondità all'interno della corticale embrionale. A E15.5 capsula e corticale embrionale hanno completato lo sviluppo. Le cellule simpato-cromaffini, continuano a migrare al centro dell'organo e si moltiplicano *in situ*. A partire da E16 si può osservare un generale aumento delle dimensioni e una graduale concentrazione delle cellule simpato-cromaffini al centro della ghiandola. queste cellule possono essere distinte per i loro piccoli nuclei finemente granulare ed il loro citoplasma grezzamente granulare che si colora profondamente con ematossilina. Da E16.5 distinte regioni corticale e midollare sono formate. Le cellule della regione corticale cominciano a mostrare segni di differenziazione: le cellule della regione più esterna vanno a formare la corticale adulta permanente, spostandosi verso il centro le cellule appaiono vacuolate e iniziano ad assumere un andamento rettilineo, e a disporsi parallele tra di loro, andando a costituire il primordio della zona fascicolata. Appena prima della nascita, la corticale mostra un arrangiamento cellulare cordonale tipico della zona fascicolata, mentre nell'estrema periferia le cellule risultano arrangiate irregolarmente come nella zona glomerulare adulta. Dal giorno della nascita, le cellule simpato-cromaffini localizzate quasi interamente al centro dell'organo, cominciano la metamorfosi in cellule midollari.

Tra la regione corticale e quella midollare inizia a formarsi uno strato di tessuto indifferenziato, detto “*Interlocking Zone*” o “zona-X”. La zona-X è costituita da diversi strati di cellule vacuolate. Quando questa regredisce si vengono a formare dei noduli di cellule immersi in tessuto connettivo tra la zona reticolare ed la regione midollare, che scompariranno poi lasciando la regione midollare e quella corticale separate solamente da un sottile strato di connettivo fibroso.

A partire dal venticinquesimo giorno dopo la nascita (P25), sono finalmente distinguibili le 3 regioni corticali: la zona glomerulare (cordoni di cellule che tendono ad avvolgersi a gomitolo

separati tra loro da stroma reticolare); zona fascicolata (cordoni di cellule disposti in colonne, parallele una all'altra, con andamento centripeto) e zona reticolata (cordoni, originati dalla zona fascicolata, che si intrecciano in una rete tridimensionale).

Nel maschio la zona-X scompare col raggiungimento della maturità sessuale, intorno a P30, mentre nella femmina permane circa fino alla prima gravidanza (Warin, 1935, Huber et al., 2009, Unsicker et al., 2005, Zubair et al., 2008, Bland et al., 2003, Deacon et al., 1986, Tsujio et al., 2009).

Dal nostro studio è emerso che già dallo stadio E12 i recettori TLR4 e TLR7 iniziano ad essere espressi nella corticale embrionale e che la loro distribuzione, con il progredire dello sviluppo, tende ad estendersi anche al primordio della regione midollare. A livello della regione corticale, la zona più intensamente marcata risulta essere quella sottostante la capsula.

I dati di questa tesi evidenziano per la prima volta che i recettori TLR4 e TLR7, che riconoscono rispettivamente la componente batterica di membrana LPS e l'RNA a singolo filamento, sono espressi nel surrene durante lo sviluppo embrionale.

L'unico altro autore, a nostra conoscenza, che ha studiato i recettori TLR nel surrene durante lo sviluppo embrionale è quello di Tran e colleghi, che ha evidenziato un'espressione costitutiva del TLR9 nella regione corticale embrionale e nella corrispondente zona fascicolata adulta (Tran et al., 2007).

La localizzazione spaziale di entrambi i recettori, in particolar modo del TLR7, a livello della zona sottocapsulare da noi osservata è di particolare interesse in quanto tutta la proliferazione cellulare nella regione corticale è limitata a questa zona (Mitani e Bland).

Siccome la corticale surrenale è un organo dinamico in cui si può osservare un costante ricambio cellulare dei suoi compartimenti, a partire dal tessuto sottocapsulare, si ritiene che questa zona contenga una distinta popolazione di cellule staminali totipotenti (Looyenga and Hammer, 2006).

Due studi in particolare, (Shulte et al. Anno e Demitrescu et al., anno) hanno descritto il processo di proliferazione cellulare durante lo sviluppo embrionale del surrene, rispettivamente nel topo e nel babbuino, utilizzando diversi marker di proliferazione (BrdU, PCNA e Ki67). Entrambi gli autori hanno evidenziato un analogo pattern di proliferazione: in stadi precoci dello sviluppo (E11.5-E13.5 per il topo) cellule in proliferazione sono distribuite in modo uniforme nel primordio del surrene, con il progredire della gestazione (da E15.5 per il topo) risultano maggiormente presenti nelle regioni più esterne, andando poi a condensarsi nella porzione sottocapsulare dell'organo appena prima della nascita.

Nell'adulto dati in letteratura hanno mostrato un'evidente diminuzione della proliferazione, localizzata a livello della zona sottocapsulare del surrene di topo, ratto e babuino (Schulte e Demitrescu; Lichtenauer, et al., 2007; mitani et al., 2003).

Siccome l'organizzazione del surrene con una regione sottocapsulare di cellule in proliferazione coinvolge solo gli stadi più tardivi dello sviluppo embrionale, queste scoperte darebbero una prova indiretta che fattori morfogenetici coinvolti nello sviluppo dell'organo si sviluppano solo tardivamente (Schulte et al., 2007). Dumitrescu e colleghi propongono anche che la diminuzione della proliferazione cellulare durante lo sviluppo possa consentire la differenziazione funzionale delle cellule della corticale fetale, portando alla produzione di ormoni steroidei importanti per la sintesi di estrogeni placentari e per la maturazione dell'organo (Demitrescu et al., 2007).

La corticale è mantenuta mediante proliferazione e rigenerazione di cellule periferiche della zona sottocapsulare che vanno incontro a migrazione in direzione centripeta, differenziano nelle specifiche zone in risposta a stimolazione endocrina e possibilmente continuano a proliferare, andando incontro a senescenza quando raggiungono il centro dell'organo. Cellule apoptotiche risultano concentrate soprattutto nelle regioni più interne della corticale.

Non è ancora noto come vari *pathway* di *signaling* regolino la zona sottocapsulare per mantenere il dinamico equilibrio tra questi due opposti gradienti di proliferazione ed apoptosi. Il bilancio tra questi due meccanismi potrebbe essere essenziale per il mantenimento omeostatico della corticale, come ad esempio lo stabilimento della differenziazione centripeta e quindi per la funzione del surrene come mediatore centrale nella risposta allo stress nei mammiferi (Kim et al., 2009; Sahutbarnola et al., 2010; Zubair, masiano e jaffe; Spencer et al., 1999).

Diversamente da Schulte e Demitrescu, alcuni autori, come Mitani e colleghi, hanno localizzato la zona proliferativa tra la zona glomerulare e la zona fascicolata e l'hanno chiamata zona indifferenziata (zU); da versanti opposti della zU originano sia i precursori della zona fascicolata e reticolare che quelli della zona glomerulare

Chamoux e colleghi hanno dimostrato i ruoli delle molecole della matrice extracellulare nel modulare la proliferazione cellulare e l'apoptosi nella corticale fetale umana.

E' noto dalla letteratura che i TLR riconoscono prodotti di degradazione di macromolecole endogene che si formano sia durante processi infiammatori, che durante il rimaneggiamento tessutale presente nei processi di sviluppo embrionale (Johnson, 2003). La presenza dei recettori TLR nel surrene in sviluppo, in particolare in questa regione sottocapsulare, potrebbe suggerire un loro possibile coinvolgimento nei processi di proliferazione, migrazione e differenziazione delle cellule progenitrici adrenocorticoidi che regolano lo sviluppo e la crescita del surrene. Questi tre processi oltre che allo sviluppo sono anche comuni alla rigenerazione e al riparo tissutale e alla

tumorigenesi. Esistono già evidenze sperimentali che collegano i recettori TLR a questi tre processi sia durante lo sviluppo embrionale che nell'adulto in situazioni normali e patologiche (Lathia, et al., 2008, Li, et al., 2010, Okun, et al., 2010, Rolls, et al., 2007, Shechter, et al., 2008). In particolare, Recenti studi hanno dimostrato che alcuni tumori adrenocorticali hanno origine da cellule precursori della linea adrenogonade pluripotenti situate in posizione sottocapsulare nella regione corticale, che ha il potenziale di differenziarsi in cellule dello stroma gonadico *harboring features of gonadal stroma* (Looyenga and Hammer, 2006; Ialli 2010).

Durante lo sviluppo embrionale, la finestra temporale d'espressione dei TLR sembra coincidere con il periodo in cui cellule adrenocorticali differenziate cominciano a comparire nella corticale. Una possibilità è che i TLR siano parzialmente responsabili della differenziazione delle cellule progenitrici adrenocorticali.

La distribuzione della marcatura che si organizza durante lo sviluppo embrionale viene mantenuta anche nel surrene murino adulto.

Dati presenti in letteratura hanno già mostrato l'espressione di alcuni TLR, tra cui il TLR4, a livello del surrene adulto: cellule della linea di carcinoma adrenocorticale umano NCI-H295R (TLR1, -2, -3, -4, -6 e -9, uomo e topo), cellule della regione corticale (TLR2 e -4, uomo; TLR9, topo) (Zacharowski 2006,2008; Vakharia, bornstein2004.2006, tran, 2007).

Alcuni autori hanno ipotizzato un ruolo per i TLR nell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Tale asse gioca un ruolo importante nella patogenesi e nello sviluppo dei processi infiammatori, modulato dall'azione delle citochine.

Bornstein e colleghi hanno dimostrato che il TLR2 ed il TLR4 sono principalmente espressi nella regione corticale: in particolare nella regione più esterna della zona glomerulare, localizzata direttamente sotto la capsula. Intensamente marcate anche cellule della zona fascicolata e reticolare. Nei loro esperimenti, l'assenza del TLR2 e del TLR4, responsabili del riconoscimento di componenti di membrana di batteri gram-positivi e gram-negativi, portava al fallimento nell'induzione di una corretta risposta allo stress glucocorticoide. Vakharia e Hinson hanno evidenziato che LPS, riconosciuto dal TLR4, agisce su cellule adrenocorticali umane stimolando la secrezione di cortisolo.(vakharia, 2004). Siccome è noto dalla letteratura che i TLR mediano la produzione di citochine rilasciate dalle cellule immunitarie in risposta ad una grande varietà di virus e batteri, andando così attivare l'asse HPA, questi autori hanno suggerito che i recettori TLR2, -4 e -9 in cellule adrenocorticali giochino un importante ruolo in questo asse (bornstein2004, tran).

La presenza a livello del surrene adulto dei recettori TLR4, già evidenziata in letteratura, e TLR7, per la prima volta mostrata in questa tesi, può essere quindi correlata alla regolazione dell'asse HPA

durante condizioni infiammatorie in cui siano presenti la componente batterica di membrana LPS e l'RNA virale.

I TLR potrebbero costituire un importante collegamento tra sistema immunitario ed endocrino ad entrambi i livelli centrale e periferico, in particolare durante l'infiammazione (bornstein 2006).

Sviluppi futuri:

Alcuni dei nostri obiettivi futuri saranno quelli di valutare la colocalizzazione dei recettori TLR4 e -7 con i seguenti marker per dimostrare che le cellule positive per tali recettori siano effettivamente:

- cellule della zona-X (20 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase, 20 α -HSD)
- cellule della regione corticale (SF1 oppure 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, 3 β -HSD)
- cellule neuroendocrine della regione midollare (Tyrosine hydroxylase, TH)
- cellule della zona glomerulosa β -catenina

e con un marker neuronale specifico per la proliferazione (PCNA) e per l'apoptosi (caspasi3, casp3) a livello del surrene.

3. Dal pancreas embrionale al pancreas adulto

Il pancreas adulto presenta due componenti distinte morfologicamente e funzionalmente di tessuto ghiandolare: una componente esocrina ed una endocrina. La porzione esocrina che include le cellule dei dotti e degli acini pancreatici, rappresenta il 95- 99% del pancreas e produce enzimi digestivi che promuovono la digestione dei nutrienti e l'assorbimento a livello dell'intestino. Le cellule endocrine, localizzate in distinti aggregati di cellule di derivazione endodermica sparsi attraverso il parenchima esocrino, che prendono il nome di isole di Langerhans, secernono ormoni nel flusso sanguigno.

Wassells e Cohen (1967) hanno dimostrato che la capacità di formare tessuto pancreatico nel topo è acquisita a E8-E9.25. La prima fase di determinazione dell'organo è chiamata *transizione regolatoria primaria* ed è definita come la conversione di cellule pre-differenziate in cellule proto-differenziate nelle quali sono presenti bassi livelli di proteine pancreatiche specifiche. A E9.5 si inizia ad osservare una condensazione del mesenchima del tubo digerente a livello dell'abbozzo duodenale. Nelle ore successive, dopo la perdita di contatto tra il tubo digerente e la notocorda, si verifica un'evaginazione dorsale dell'endoderma nel mesenchima sovrastante. Questa evaginazione si allunga andando a formare il *primordio dorsale del pancreas*. Ad E10.25-E10.5, in posizione

caudale rispetto all'evaginazione del primordio epatico, si sviluppa un'altra evaginazione che andrà a formare il *primordio ventrale del pancreas*. Dopo questa prima evaginazione del pancreas dorsale e ventrale, multipli fattori sembrano determinare la selezione tra linea acinare, endocrina e duttale. . La decisione tra destino acinare ed endocrino sembra accadere alle estremità in crescita delle ramificazioni epiteliali, tra E11 e E14 (Zhou et al., 2007; (Gittes, 2009). A E10.5-E11, i primordi pancreatici vanno incontro ad allungamento della regione basale e a ramificazione “ ad angolo acuto” della regione più apicale del primordio, che tende ad escludere l'intervento del mesenchima. L'esclusione del mesenchima può influenzare le interazioni epitelio-mesenchimali e la selezione della linea cellulare. A E12 comincia il processo d'innervazione, iniziano ad essere visibili cellule gangliari e fibre amieliniche. A questo stadio di sviluppo alcune cellule endocrine iniziano a presentare granuli. Tra E12 e E12.5, come risultato della rotazione di stomaco e duodeno e dell'allungamento dei condotti dorsale e ventrale (che daranno poi origine al dotto pancreatico principale), i primordi ventrale e dorsale vengono a contatto l'uno con l'altro a livello dell'ansa del primordio duodenale. I due primordi si fondono in un unico organo interconnesso intorno a E12.5-E13: il primario ventrale forma la porzione posteriore della testa o processo uncinato, mentre il primordi dorsale forma la parte restante dell'organo. Si ha, inoltre, una fusione del dotto ventrale con la parte distale del dotto dorsale, che andranno a costituire il primitivo dotto di Wirsung; la porzione prossimale del dotto dorsale persiste, anche se più piccola e accessoria, come dotto di Santorini.

A E13-E14, si osservano grandi cambiamenti nell'architettura cellulare dell'organo: la crescita e la ramificazione di entrambi i primordi del pancreas, che iniziano a mostrare primi segni di differenziazione.

La *transizione regolatoria secondaria* (E13.5-E16.5) è la conversione delle cellule proto-differenziate in cellule pienamente differenziate, caratterizzate da un grande aumento nella sintesi di proteine specifiche del pancreas e dalla perdita di capacità proliferative. A E13.5-E14 si verifica inoltre una rapida formazione di ramificazioni ed una differenziazione delle cellule acinari, accompagnata da un aumento esponenziale dell'espressione genica di enzimi acinari, dallo sviluppo di un espanso reticolo endoplasmatico rugoso e dalla produzione di granuli di zimogeno. Comincia inoltre la vascolarizzazione dell'organo. A E14.5 le cellule epiteliali pancreatiche, stimolate da segnali mesenchimali, proliferano e ramificano; acini e dotti sono chiaramente riconoscibili. A questo stadio, le cellule endocrine si trovano come singole cellule in stretta associazione con i dotti biliari o arrangiate in piccoli gruppi cellulari. A E15, il dotto biliare comune e il dotto epatico destro sono chiaramente visibili. Le isole di Langerhans sono visibili per la prima volta a E16, ma le cellule β non sono ancora evidenziabili. Sempre a questo stadio risulta visibile la differenziazione

dei dotti esocrini che risultano avere un lume proprio. A E17.5-E18, il pancreas risulta costituito da tessuto ghiandolare ramificato suddiviso da una delicata rete di tessuto connettivo in piccoli lobuli. E' un organo ben differenziato: immerse nel parenchima esocrino si vedono chiaramente le isole di Langerhans, in cui le cellule α si trovano in posizione periferica e le cellule β in posizione centrale. La *terza transizione regolatoria* avviene dopo la nascita e denota l'adattamento alla sintesi regolata dall'alimentazione e alla secrezione di proteine specifiche del pancreas (Gittes, 2009, Kim and Hebrok, 2001, Slack, 1995).

Ad E12 la marcatura per il TLR4 risulta più intensa ed estesa a tutte le cellule dei primordi del pancreas rispetto a quella del TLR7 localizzata solo in poche cellule. Con il progredire dello sviluppo è possibile osservare che i due recettori sembrano caratterizzare tipi cellulari con diverso destino cellulare: il TLR4 risulta principalmente espresso in acini in via di differenziamento (componente esocrina) ed il TLR7 è invece localizzato nell'area in cui si trovano dotti e cellule endocrine (componente endocrina) in via di differenziamento. E' interessante osservare che la finestra temporale in cui compare l'espressione dei recettori TLR coincide con il periodo in cui si determina la scelta differenziativa in senso esocrino o endocrino (E11-E14) (Zhou et al., 2007; (Gittes, 2009).

Dati in letteratura hanno evidenziato parallelismi tra lo sviluppo endocrino pancreatico e lo sviluppo neuronale, aprendo lo studio della via di segnale di Notch, un regolatore della differenziazione neuronale in *Drosophila*, anche nello sviluppo pancreatico. Notch gioca un ruolo nella crescita e nella ramificazione dell'epitelio pancreatico indifferenziato ed è implicato nella specificazione pancreaticata dell'endoderma e anche nella formazione dei dotti. Il *signaling* di Notch è uno dei meccanismi più significativi per promuovere la differenziazione in cellule endocrine o esocrine durante lo sviluppo del pancreas (gittes G. K., 2008; Kim and Hebrok, 2001). La non attivazione della via di segnale Notch tra E13 ed E15 nel ratto (circa E11.5-E12.5 nel topo) porta all'assenza di cellule degli acini con persistenza di cellule progenitrici epiteliali.

Diversi dati in letteratura dimostrano che il *signaling* di Notch è attivato dalla stimolazione del *signaling* TLR (Palaga T. et., 2008).

In nostri dati hanno messo in evidenza una particolare espressione del recettore TLR7 nelle aree del pancreas embrionale in cui sono presenti i dotti e le cellule endocrine in via di differenziamento. Dati in letteratura hanno dimostrato che proteine della matrice extracellulare (ECM) o molecole implicate nell'adesione cellulare come Ep-CAM giocano un ruolo nella differenziazione delle cellule endocrine. Le isole di Langerhans sono generate in un processo complesso costituito da molte fasi che coinvolge la differenziazione delle cellule progenitrici nell'epitelio duttale

pancreatico, la migrazione di questi precursori attraverso la membrana basale nel mesenchima circostante e la successiva associazione delle cellule che producono ormoni nelle isole mature. L'organizzazione dei tipi cellulari endocrini in strutture a isola potrebbe essere regolata da integrine, recettori transmembrana che sono espressi nelle isole endocrine ed in particolare a livello delle cellule β e che legano le proteine ECM. A supporto di questa ipotesi, Cirulli e colleghi hanno dimostrato che alcune integrine mediano adesione e migrazione dei precursori endogeni. Il significato funzionale di queste interazione cellula-matrice è stato dimostrato in studi riguardanti la perdita di responsività al glucosio in cellule endocrine in coltura. In questi studi, cellule endocrine isolate, tenute su supporti di plastica/su petri senza il supporto della matrice, perdono la loro capacità di rilasciare insulina dopo la stimolazione con concentrazioni fisiologiche di glucosio. La responsività al glucosio era ristabilita quando le cellule delle isole erano messe in coltura su preparati di matrice extracellulare, suggerendo che il mantenimento della funzionalità delle cellule β è almeno in parte conferita dal legame con i recettori per le integrine (bosco et al., 2000). In aggiunta ai segnali cellula-matrice, anche interazioni cellula-cellula sono richieste per stabilire l'architettura delle singole isole. Queste interazioni possono mediate da membri della famiglia delle caderine. Kim e Hebrok hanno inoltre dimostrato che la migrazione delle cellule precursori delle isole endocrine è parzialmente controllata dalle metallo-proteinasi della matrice, un'ampia famiglia di enzimi che degradano proteine della matrice extracellulare tra cui collagene, gelatine, fibronectine e laminine. La degradazione della matrice e il rimodellamento è cruciale per la morfogenesi epiteliale e per la migrazione dei precursori endocrini (Kim and Hebrok, 2001).

Un possibile legame fra questi complessi aspetti differenziativi della componente endocrina e l'espressione del TLR7 da noi osservata potrebbe risiedere nella capacità che i TLR hanno di legare componenti della matrice extracellulare che si formano durante il rimaneggiamento di quest'ultima sia in situazioni di danno tissutale che durante lo sviluppo embrionale (Schaefer et al., 2005; Iozzo and Schaefer, 2010 ,Brunn, 2005; Johnson, 2002) e di modulare attività metalloproteinasiche (West et al 2008).

Le nostre osservazioni su embrioni allo stadio E16 ci hanno permesso di evidenziare la presenza di un'intensa marcatura per il recettore TLR7 in fibre nervose e in gruppi di cellule di probabile natura nervosa. E' noto dalla letteratura, che già allo stadio E 12.5 sono visibili nell'abbozzo pancreatico elementi PGP9.5-positivi che stanno iniziando a formare piccoli gangli (Jiang Y. et al., 2003).

Le cellule che danno origine a queste strutture gangliari originano per migrazione dal plesso mienterico intestinale tra E13 ed E15. E' altamente significativo il fatto che dati precedenti del nostro laboratorio presentati sotto forma di *abstract* a congressi abbiano evidenziato che il plesso

mienterico in via di sviluppo nell'intestino murino esprime il recettore TLR7, sostanziando di fatto questa ulteriore osservazione nei gangli-putativi pancreatici.

Nel pancreas murino adulto, la marcatura per entrambi i recettori risulta estesa a tutte le cellule dell'organo con diversa localizzazione cellulare.

Dati presenti in letteratura sul pancreas adulto hanno già mostrato l'espressione di alcuni TLR, tra cui il TLR4, in tutti i tipi cellulari epatici: cellule stellate del pancreas (TLR2, -3, -4 e -5); cellule endocrine, in particolare cellule β (TLR2, -3, -4, -7 e -9, uomo e topo); cellule endoteliali dei vasi (TLR4, uomo e topo); cellule epiteliali dei dotti (TLR4, uomo e topo) (Mesamune A. et al., 2008; Blander e Medzhitov; Vives-Pi M. et al., 2003 ; Lang K. S. et al., 2005 ; Bollyky et al., 2009 ; Zhang X. et al., 2010).

Le osservazioni svolte in questo studio convalidano ed ampliano tali dati, approfondendone gli aspetti localizzativi. I dati di questa tesi evidenziano per la prima volta che il TLR7, che riconosce l'RNA a singolo filamento, è espresso nella porzione esocrina del pancreas murino adulto, in particolare a livello delle cellule degli acini, delle cellule epiteliali dei dotti e delle cellule centro acinose. Per quanto riguarda il TLR4, i nostri dati dimostrano che il TLR4 è espresso nel nucleo e nella porzione basale del citoplasma di quasi tutte le cellule acinari.

Molti TLR sono risultati presenti nella porzione esocrina del pancreas adulto suggerendo un loro coinvolgimento nel rilevamento di un ampio spettro di batteri e virus, in grado di infettare il pancreas e indurre pancreatite acuta e cronica. In particolare, Mesamune e colleghi hanno ipotizzato che la lisi delle cellule infettate da questi virus potrebbe portare al rilascio di RNA a doppio filamento che poi può essere riconosciuto dai TLR3 presenti sulle cellule adiacenti, tra cui le cellule stellate pancreatiche (Mesamune A. et al., 2008).

Il TLR7, che riconosce l'RNA virale a singolo filamento, potrebbe giocare una simile funzione.

L'abilità di internalizzare materiali extracellulari è stata descritta anche in altri tipi cellulari fibrogenici come ad esempio cellule mesangiali e cellule stellate epatiche, così come in cellule che presentano l'antigene tra cui le cellule endoteliali dei sinusoidi epatiche (in cui è già nota l'espressione di alcuni recettori TLR). Blander e Medzhitov mostrarono che l'attivazione del TLR2 e TLR4 da parte di batteri regola le diverse fasi del processo di fagocitosi che comprende l'internalizzazione e la maturazione del fagosoma, suggerendo un ruolo per i TLR nella regolazione della fagocitosi (Blander and Medzhitov).

L'espressione dei TLR a livello delle isole di Langerhans suggerisce che questi recettori possano giocare un ruolo in questa sede, per esempio nel mantenere l'omeostasi. I dati raccolti da Vives-Pi e colleghi indicano che LPS, ligando del TLR4, potrebbe agire direttamente sulle cellule β , non solo riducendo la produzione di insulina, ma anche iniziando la produzione di citochine. L'espressione

del complesso recettoriale LPS/TLR4 colloca le cellule β alla giunzione tra la risposta immunitaria innata e adattativa, potenziale *checkpoint* nello sviluppo delle malattie autoimmunitarie (Vives-Pi M. et al., 2003). Sebbene le isole di Langerhans, e per altro anche il fegato, non siano comunemente considerati parte dell'interfaccia ospite-microbo, alcuni autori vista l'espressione dei recettori TLR in queste sedi suggeriscono che entrambe possano invece farne parte. (Bollyky et al., 2009; Zhang X. et al., 2010).

Sviluppi futuri:

In un recente studio Gittes sostiene che Neurogenin 3 (ngn3), un particolare fattore di trascrizione la cui espressione è repressa nella via di segnale intracellulare mediata da Notch, potrebbe essere utilizzato come ottimo marker dei progenitori endocrini pancreatici dell'adulto e dell'embrione. Reazioni di colocalizzazione dei recettori TLR4 e -7 con neu3 ci consentirebbero, quindi, di identificare chiaramente progenitori endocrini pancreatici dell'adulto e dell'embrione.

4. Dal fegato embrionale al fegato adulto

Il fegato è un organo complesso che cambia nettamente la sua funzione durante lo sviluppo embrionale e nell'organismo adulto, andando perciò incontro ad estese modificazioni morfofunzionali (Tanaka et al., 2009).

Ad oggi, a nostra conoscenza, non sono presenti dati in letteratura che riguardano l'espressione dei recettori TLR durante lo sviluppo embrionale di tale organo.

A partire da E8 si può osservare un addensamento di cellule endodermiche della porzione caudale dell'intestino anteriore che, a partire dallo stadio E9, dà origine ad un'evaginazione dell'endoderma, il *diverticolo epatico*, la prima evidenza morfologica del fegato embrionale. La porzione anteriore del diverticolo darà origine al fegato e all'albero biliare intraepatico, mentre quella posteriore alla colecisti ed all'albero biliare extraepatico.

Il primo segnale per l'induzione dell'abbozzo epatico è fornito dal mesoderma cardiaco. Un secondo stadio di induzione epatica coinvolge il mesenchima del setto trasverso (STM) che viene invaso, tra E9 ed E9.5, dalle cellule pre-epatiche, gli epatoblasti, delaminate dall'epitelio. Si forma così il *primordio del fegato*. Il STM contribuirà a formare i fibroblasti e le cellule stellate del fegato. Tra E10 ed E11.5, il fegato accresce notevolmente le sue dimensioni. Tale espansione è principalmente dovuta all'invasione dell'STM da parte di foglietti epiteliali del primordio del fegato che si allungano e ramificano andando a formare i cordoni (biliari) epatici. Il parenchima del fegato

viene invaso da numerosi vasi, principalmente originati dal sacco vitellino, che andranno a formare i sinusoidi epatici interponendosi ai cordoni epatici. A partire dallo stadio E10.5, il fegato sostituisce il sacco vitellino come principale *organo ematopoietico* ed accoglie i globuli rossi nucleati provenienti dal sacco vitellino, che persisteranno nell'organo per diversi giorni, prima di entrare nel circolo sanguigno. A E11, il parenchima risulta così composto da epatoblasti sparsi tra cellule ematopoietiche (eritroblasti) in rapida proliferazione. Tra E10.5 ed E11.5, si assiste ad una rapida attivazione del processo di trombocitosi: i megacariociti si differenziano in piastrine e le immettono in circolo. A E12, il fegato occupa gran parte della cavità addominale e si può notare la formazione degli spazi interlobulari che andranno a definire successivamente i lobuli/lobi epatici. Tra E12 ed E14 si possono anche osservare importanti cambiamenti vascolari che porteranno alla comparsa della vena cava caudale, delle vene centrolobulari e delle vene portalì. Inoltre, nello spazio peri-sinusoidale fanno la loro comparsa le cellule stellate epatiche, le cellule di Ito. Il fegato appare un organo ben differenziato ed a E13.5 raggiunge la sua architettura embrionale finale (a partire da questo stadio tutti i cambiamenti nel fegato in sviluppo avverranno a livello cellulare). A questo stadio, si ha un picco dell'attività ematopoietica: il parenchima epatico risulta occupato per il 75% da isole eritroblastiche sparse principalmente localizzate al centro dell'organo, mentre gli epatoblasti risultano più concentrati alla periferia rispetto che al centro dell'organo. A E14, la popolazione ematopoietica presente nel fegato è costituita da un numero elevato di megacariociti e basso di granulociti, sparsi nel parenchima dell'organo. Inoltre il numero dei progenitori linfoidi T è diminuito notevolmente in favore della proliferazione dei progenitori linfoidi B. Ad E14-E14.5, la funzione principale del fegato si sposta dall'eritropoiesi al *metabolismo epatico*. La maggior parte degli epatoblasti nel parenchima del fegato si differenzia in epatociti, mentre quelli localizzati nelle nascenti zone periportalì danno origine a cellule epiteliali biliari, conosciute come colangiociti, che andranno a rivestire il lume dei dotti biliari intraepatici. A E15, si osservano chiaramente sinusoidi epatici e capillari biliari nel parenchima epatico. L'attività eritropoietica comincia a diminuire, in favore prima del timo e poi della milza, ma è ancora significativa. Gli eritrociti presenti nel parenchima sono ancora nucleati, ma quelli intravascolari iniziano ad estrarre il nucleo. I megacariociti sono ancora presenti in numero elevato. Tra E15.5 ed E16 la suddivisione del fegato in lobuli è completa. L'eritropoiesi nel fegato continua a diminuire, gli epatociti si accrescono, proliferano e prendono contatto l'uno con l'altro, in modo molto evidente soprattutto in periferia. Gli eritrociti si spostano verso le vene centrolobulari. I colangiociti si organizzano intorno al mesenchima portale a formare un anello costituito da un singolo strato di cellule, chiamato piastra duttale. A E16.5, l'anello di colangiociti si ispessisce costituendo un doppio strato di cellule che successivamente, dilatandosi, andrà a formare i dotti biliari. I megacariociti sono ancora molto

presenti e i progenitori dei granulociti aumentano di numero, costituendo piccoli focolari sparsi o rimanendo isolati all'interno del fegato. Tra E17 e E17.5, l'eritropoiesi regredisce fino al 30%. Gli eritrociti sono tutti privi di nucleo e presentano dimensioni regolari, mentre gli epatociti riducono le dimensioni del nucleo per lasciare posto alla crescita citoplasmatica e all'accumulo di glicogeno, che inizia a questo stadio. A questo stadio, gli epatociti sono ben differenziati e cominciano ad organizzarsi in cordoni epatici. I megacariociti sono ancora presenti, ma in numero inferiore rispetto agli stadi precedenti. I granulociti e i linfociti B aumentano di numero e si raggruppano i primi, intorno alle vene centrolobulari e alla periferia dell'organo, e i secondi in aggregato ematopoietici perivascolari. A E18, tutte le cellule ematopoietiche si muovono verso lo spazio portale e si trovano nel parenchima solo in piccoli focolai isolati, mentre gli epatociti continuano ad organizzarsi in cordoni epatici. Il sistema biliare risulta ben differenziato. Avvicinandosi alla nascita, i dotti cominciano ad essere incorporati nel mesenchima portale. Lo sviluppo epatico continua per due o tre settimane dopo la nascita, prima che l'organizzazione finale dei cordoni epatici e dei dotti biliari sia definitivamente raggiunta {Crawford, 2010, Histology atlas of the developing mouse hepatobiliary system with emphasis on embryonic days 9.5-18.5; Zorn, 2008, Liver development}.

Lo schema di marcatura del parenchima epatico da noi osservato, soprattutto per quel che riguarda il TLR4, sembra riflettere alcuni aspetti dello schema di maturazione dell'organo come sopra delineato. Infatti il maggior addensamento di cellule marcate di probabile natura epatoblastica è presente inizialmente alla periferia del fegato per poi estendersi al suo interno in maniera più consistente allo stadio E14, dove gli elementi immunoreattivi sono addensati anche intorno alle vene centrolobulari. Allo stadio E16 è già osservabile un declino della marcatura, precursore di quella che sarà la situazione nell'organo adulto. L'espressione dei TLR nella componente epatoblastica abbraccia dunque il periodo di iniziale strutturazione del parenchima epatico ed inizia a declinare quando il fegato incomincia la sua transizione da organo ematopoietico fetale a ghiandola esocrina/endocrina adulta.

E' difficile in base ai dati attualmente a nostra disposizione spiegare il significato di tale pattern di espressione. Tuttavia, dati in letteratura indicano che la citochina pro-infiammatoria IL-1 e il suo recettore IL-1R, omologo del dominio intracellulare dei TLR, risultano espressi nel fegato fetale, dove regolano le cellule staminali ematopoietiche e la differenziazione mieloide in questo tessuto, probabilmente attraverso la sopravvivenza cellulare (Orelkio et al., 2009).

E' stato inoltre proposto che i TLR possano iniziare processi quali proliferazione, differenziazione e sopravvivenza dei progenitori emopoietici in un modo simile a quello delle citochine endogene (McGettrick and O'Neill, 2007). Sioud e colleghi propongono che il TLR7 e il TLR8, attraverso

l'attivazione di citochine ed altre proteine segnali, possano influenzare l'omeostasi delle cellule progenitrici emopoietiche umane. La via di segnale attraverso la quale questi recettori inducono la differenziazione cellulare lungo la linea mieloide, suggerisce un possibile legame tra l'immunità innata e l'ematopoiesi nell'uomo (Sioud et al., 2006; Nagai et al., 2006; De Luca et al., 2009).

Oltre agli elementi epatoblastici appaiono chiaramente marcati i megacariociti, in un periodo coincidente con la loro differenziazione ed intensa attività trombocitopoietica. Il rapido inizio del processo di trombopoiesi tra 10.5 ed E11.5 nel topo, suggerisce che le piastrine possano essere richieste durante la gestazione (Tober et al., 2007) e che analogamente a quanto osservato nell'adulto, i TLR possono essere coinvolti in tale produzione.

Nell'adulto, precedenti studi hanno mostrato l'espressione dei recettori TLR sia a livello dei megacariociti (TLR1, -4 e -6, uomo) che a livello dei loro prodotti cellulari, le piastrine (TLR2, -4 e -9, topo) (Andonegui et al., 2005; Cognasse et al., 2005; Ward et al., 2005). Le piastrine hanno un ruolo importante nel processo di emostasi (adesione e aggregazione) e nell'immunità innata. Un recente studio ha suggerito un ruolo dei TLR nel processo di emostasi, dimostrando che l'attivazione del TLR2 con un ligando sintetico, Pam₃CSK4, provoca l'aggregazione e l'adesione delle piastrine (Beaylieu and Freedman, 2009).

Nel fegato adulto la marcatura per i recettori TLR4 e TLR7 negli epatociti, seppur meno intensa, risulta essere ancora presente nella zona intorno alle vene centrolobulari, e risultano inoltre chiaramente marcati i colangiociti che rivestono i canalicoli biliari e le cellule di Kupffer (macrofagi residenti nel fegato).

Dati presenti in letteratura sul fegato adulto hanno già mostrato l'espressione di alcuni TLR, tra cui il TLR4, in tutti i tipi cellulari epatici: cellule di Kupffer (TLR2, -3, -4 e -9); epatociti (TLR2, -3, -4 e -5); cellule stellate epatiche (TLR4 e -9); cellule epiteliali biliari (TLR2, -3, -4 e -5), cellule endoteliali sinusoidali (TLR4 e -9), cellule dendritiche epatiche (TLR4) (Schwabe et al., 2006; Maeda S., 2010; Seki and Brenner, 2008; Martin-Armas et al., 2006).

Le osservazioni svolte durante questa tesi convalidano tali dati sul TLR4, chiarendone gli aspetti localizzativi, ed evidenziano per la prima volta che il TLR7, che riconosce l'RNA a singolo filamento, è espresso nel fegato adulto, analogamente ad altri recettori che riconoscono RNA virali, come ad esempio il TLR3.

Il fegato è costantemente esposto a prodotti microbici, tra cui LPS e DNA batterico, provenienti dalla microflora intestinale e portati al fegato attraverso lo spazio portale. Il fegato normalmente regola la risposta immunitaria innata in parte attraverso la modulazione dei segnali TLR. Un'eccessiva attivazione del *signaling* dei TLR può causare danni a livello del fegato.

L'espressione dei recettori da noi presi in esame, TLR4 e TLR7, a livello delle cellule di Kupffer è facilmente spiegabile in quanto sono le principali cellule deputate a fagocitosi, presentazione dell'antigene e produzione di citochine infiammatorie. Questi macrofagi, localizzati a livello dei sinusoidi epatici, sono la prima linea cellulare che incontra le tossine/prodotti microbici (clearance del sangue) derivati dall'intestino, tra cui LPS, riconosciuto specificamente dal TLR4. Altri dati suggeriscono che le cellule di Kupffer o i loro progenitori possano essere coinvolti nella maturazione di eritrociti durante l'ematopoiesi del fegato fetale. Un possibile ruolo dei TLR in questo processo di maturazione sarebbe da indagare (Si-Tayeb et al., 2010).

In base ai dati disponibili in letteratura sembra plausibile che gli epatociti, insieme alle cellule di Kupffer, servano a rimuovere MAMP, come LPS, dalla circolazione sistemica e rappresentino quindi un'importante interfaccia tra ospite ed agenti patogeni (Schwabe et al., 2006; Maeda S., 2010; Seki and Brenner, 2008).

Sviluppi futuri:

Un futuro obiettivo sarà quello di valutare la colocalizzazione dei recettori TLR4 e -7 con EpCAM, un marker per epatoblasti durante l'epatogenesi, al fine di definire chiaramente la natura dei gruppi di cellule sparsi nel parenchima epatico durante lo sviluppo embrionale.

5. Significato generale espressione embrionale dei TLR

L'espressione precoce di questi recettori durante lo sviluppo embrionale potrebbe portare a formulare una duplice ipotesi sul ruolo dei TLR: da un lato un ruolo preparatorio alle risposte immunitarie postnatali e dall'altro un possibile coinvolgimento nei meccanismi dello sviluppo che regolano la proliferazione, la differenziazione e la sopravvivenza. Questi tre processi oltre che allo sviluppo sono anche comuni alla rigenerazione e al riparo tissutale e alla tumorigenesi. Esistono già evidenze sperimentali che collegano i recettori TLR a questi tre processi sia durante lo sviluppo embrionale che nell'adulto in situazioni normali e patologiche (Lathia, et al., 2008, Li, et al., 2010, Okun, et al., 2010, Rolls, et al., 2007, Shechter, et al., 2008).

Dati in letteratura hanno dimostrato la presenza del recettore TLR4 in tutti e tre gli organi adulti da noi analizzati. Le osservazioni svolte durante questa tesi, oltre che convalidare tali dati, ne approfondiscono gli aspetti localizzativi.

Dal confronto dei dati sull'embrione con quelli dell'adulto risulta evidente come l'espressione del TLR4 vada incontro a rimaneggiamenti nella distribuzione e a una progressiva diminuzione, quest'ultima particolarmente evidente nel parenchima epatico. Per quanto riguarda il TLR7, ad oggi non sono presenti in letteratura studi sull'immunolocalizzazione di questo recettore negli organi adulti da noi presi in esame. Solo Schwabe et al. (2006) e Zanczkowski et al. (2009) hanno riportato bassi livelli di mRNA di tale recettore a livello del fegato murino e della linea cellulare umana di carcinoma adrenocorticale NCI-H295R.

I dati di questa tesi evidenziano per la prima volta che il TLR7, che riconosce l'RNA a singolo filamento, è espresso in surrene, pancreas e fegato, analogamente ad altri recettori che riconoscono RNA virali, come ad esempio il TLR3.

Recenti studi hanno mostrato la presenza del recettore TLR3 in pancreas (cellule stellate, ratto; cellule β , topo e uomo) (Bollyky, et al., 2009, Masamune, et al., 2008), fegato (cellule epiteliali dei dotti biliari, topo; epatociti, topo) (Schwabe, et al., 2006, Seki and Brenner, 2008) e surrene (cellule adrenocorticoidi, uomo) (Kanczkowski, et al., 2009).

La presenza dei recettori TLR4 e TLR7 negli organi adulti è probabilmente correlata alla principale funzione da loro svolta nell'ambito delle risposte immunitarie innate e del loro contributo alle patologie infiammatorie e tumorali.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson KV, Bokla L, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, vol 42, United States, pp 791-798
- Bollyky PL, Bice JB, Sweet IR, Falk BA, Gebe JA, Clark AE, Gersuk VH, Aderem A, Hawn TR, Nepom GT (2009) The toll-like receptor signaling molecule Myd88 contributes to pancreatic beta-cell homeostasis in response to injury. *PLoS One* 4:e5063
- Eldon E, Kooyer S, D'Evelyn D, Duman M, Lawinger P, Botas J, Bellen H (1994) The *Drosophila* 18 wheeler is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development* 120:885-899
- Gay NJ, Keith FJ (1991) *Drosophila* Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351:355-356
- Gittes GK (2009) Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol*, vol 326, United States, pp 4-35
- Goldner J (1938) A modification of the masson trichrome technique for routine laboratory purposes. *Am J Pathol* 14:237-243
- Harris G, KuoLee R, Chen W (2006) Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 12:2149-2160
- Hoffmann JA (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* 426:33-38
- Janeway CA, Jr., Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216
- Kanczkowski W, Zacharowski K, Wirth MP, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR (2009) Differential expression and action of Toll-like receptors in human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*, vol 300, Ireland, pp 57-65
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, vol 11, United States, pp 373-384
- Kim SK, Hebrok M (2001) Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes Dev* 15:111-127
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, vol 388, United States, pp 621-625
- Lathia JD, Okun E, Tang SC, Griffioen K, Cheng A, Mughal MR, Laryea G, Selvaraj PK, French-Constant C, Magnus T, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like receptor 3 is a negative regulator of embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurosci* 28:13978-13984
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, vol 86, United States, pp 973-983

- Leulier F, Lemaitre B (2008) Toll-like receptors--taking an evolutionary approach. *Nat Rev Genet* 9:165-178
- Li X, Jiang S, Tapping RI (2010) Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*, vol 49. 2009 Elsevier Ltd, United States, pp 1-9
- Lichtenauer UD, Duchniewicz M, Kolanczyk M, Hoefflich A, Hahner S, Else T, Bicknell AB, Zemojtel T, Stallings NR, Schulte DM, Kamps MP, Hammer GD, Scheele JS, Beuschlein F (2007) Pre-B-cell transcription factor 1 and steroidogenic factor 1 synergistically regulate adrenocortical growth and steroidogenesis. *Endocrinology* 148:693-704
- Lohr J, Gut P, Karch N, Unsicker K, Huber K (2006) Development of adrenal chromaffin cells in Sf1 heterozygous mice. *Cell Tissue Res* 325:437-444
- Looyenga BD, Hammer GD (2006) Origin and identity of adrenocortical tumors in inhibin knockout mice: implications for cellular plasticity in the adrenal cortex. *Mol Endocrinol*, vol 20, United States, pp 2848-2863
- Masamune A, Kikuta K, Watanabe T, Satoh K, Satoh A, Shimosegawa T (2008) Pancreatic stellate cells express Toll-like receptors. *J Gastroenterol* 43:352-362
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J (2001) Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414:756-759
- Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tabata S (1994) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1 (supplement). *DNA Res* 1:47-56
- Okun E, Griffioen KJ, Son TG, Lee JH, Roberts NJ, Mughal MR, Hutchison E, Cheng A, Arumugam TV, Lathia JD, van Praag H, Mattson MP (2010) TLR2 activation inhibits embryonic neural progenitor cell proliferation. *J Neurochem* 114:462-474
- Poltorak A, Smirnova I, He X, Liu MY, Van Huffel C, McNally O, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Du X, Thompson P, Chan EK, Ledesma J, Roe B, Clifton S, Vogel SN, Beutler B (1998) Genetic and physical mapping of the Lps locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells Mol Dis* 24:340-355
- Rolls A, Shechter R, London A, Ziv Y, Ronen A, Levy R, Schwartz M (2007) Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis. *Nat Cell Biol* 9:1081-1088
- Schwabe RF, Seki E, Brenner DA (2006) Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology*, vol 130, United States, pp 1886-1900

- Seki E, Brenner DA (2008) Toll-like receptors and adaptor molecules in liver disease: update. *Hepatology* 48:322-335
- Shechter R, Ronen A, Rolls A, London A, Bakalash S, Young MJ, Schwartz M (2008) Toll-like receptor 4 restricts retinal progenitor cell proliferation. *J Cell Biol* 183:393-400
- Slack JM (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121:1569-1580
- Sommer RJ (2009) The future of evo-devo: model systems and evolutionary theory. *Nat Rev Genet*, vol 10, England, pp 416-422
- Williams MJ, Rodriguez A, Kimbrell DA, Eldon ED (1997) The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J* 16:6120-6130